

VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ – TECHNICKÁ UNIVERZITA
Fakulta Materiálově - Technologická
Katedra Fyzikální Chemie a Teorie Technologických Procesů

Stanovení stopových množství organických látek v biologickém materiálu s využitím mikrovlnného reaktoru k přípravě vzorků

Diplomová práce

Autor práce: Hana Vjatráková
Vedoucí práce: Mgr. Pavel Buček, Ph.D.

2019

VSB - TECHNICAL UNIVERSITY OF OSTRAVA
Faculty Materials - Technology
Department of Physics Chemistry and Theory of Technological Processes

Determination of trace amounts of organic substances in biological material using microwave reactor for sample preparation

Diploma Thesis

Author: Hana Vjatráková
Supervisor: Mgr. Pavel Buček, Ph.D.

2019

Zadání diplomové práce

Student:

Bc. Hana Vjatráková

Studijní program:

N3909 Procesní inženýrství

Studijní obor:

2805T019 Chemické a environmentální inženýrství

Téma:

**Stanovení stopových množství organických látek v biologickém
materiálu s využitím mikrovlnného reaktoru k přípravě vzorků
Determination of trace amounts of organic substances in biological
material using microwave reactor for sample preparation**

Jazyk vypracování:

čeština

Zásady pro vypracování:

1. Zpracování literární rešerše dané problematiky.
2. Příprava vzorků pro analýzu stopových množství organických látek.
3. Experimentální měření a jejich vyhodnocení.
4. Srovnání účinnosti klasických a nově použitých metod.

Seznam doporučené odborné literatury:

1. Bartolomé, E.; et al. Simultaneous microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, phthalate esters and nonylphenols in sediments. *Journal of Chromatography A* 1068 (2005) 229-236.
2. Foan, L.; et al. Reconstructing historical trends of polycyclic aromatic hydrocarbon deposition in a remote area of Spain using herbárium moss material. *Atmospheric Environment* 44 (2010) 3207-3214.
3. Holoubek, I.; et al. The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. *Environmental Pollution* 109 (2000) 283-292.
4. Bartoš, J.; *Stanovení kapsaicinu v biologickém materiálu*. Bakalářská práce, Univerzita Hradec Králové (2014).

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavel Buček, Ph.D.**

Datum zadání: 30.11.2018

Datum odevzdání: 23.04.2019



prof. Ing. Jana Dobrovská, CSc.
vedoucí katedry

prof. Ing. Jana Dobrovská, CSc.
děkanka fakulty

Zásady pro vypracování diplomové práce

I.

Diplomovou prací (dále jen DP) se ověřují vědomosti a dovednosti, které student získal během studia, a jeho schopnosti využívat je při řešení teoretických i praktických problémů.

II.

Uspořádání diplomové práce:

- | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 1. Titulní list | 6. Abstrakt + klíčová slova česky a anglicky |
| 2. Originál zadání DP | 7. Obsah DP |
| 3. Zásady pro vypracování DP | 8. Textová část DP |
| 4. Prohlášení + místopřísežné prohlášení | 9. Seznam použité literatury |
| 5. Prohlášení spolupracující právnické nebo fyzické osoby o souhlasu se zveřejněním DP | 10. Přílohy |

- ad 1) Titulní list je koncipován podle požadavků příslušné oborové katedry.
- ad 2) Originál zadání DP student obdrží na své oborové katedře.
- ad 3) Tyto „Zásady pro vypracování diplomové práce“ následují za originálem zadání DP.
- ad 4) Prohlášení + místopřísežné prohlášení napsané na zvláštním a vlastnoručně podepsané studentem s uvedením data odevzdání DP.
- ad 5) V případě, že DP vychází ze spolupráce s jinými právníckými a fyzickými osobami a obsahuje citlivé údaje, je na zvláštním listě vloženo prohlášení spolupracující právnické nebo fyzické osoby o souhlasu se zveřejněním DP.
- ad 6) Abstrakt a klíčová slova jsou uvedena na zvláštním listu česky a anglicky v rozsahu max. 1 strany pro obě jazykové verze.
- ad 7) Obsah DP se uvádí na zvláštním listu. Zahrnuje názvy všech očíslovaných kapitol, podkapitol a statí textové části DP, odkaz na seznam příloh a seznam použité literatury s uvedením příslušné stránky. Předpokládá se desetinné číslování.
- ad 8) Textová část DP obvykle zahrnuje:
- Úvod, obsahující charakteristiku řešeného problému a cíle jeho řešení v souladu se zadáním DP;
 - Vlastní rozpracování DP (včetně obrázků, tabulek, výpočtů) s dílčími závěry vhodně členěné do kapitol a podkapitol podle povahy problému;
 - Závěr, obsahující celkové hodnocení výsledků DP z hlediska stanoveného zadání.

DP bude zpracována v rozsahu min. cca 45 stran (včetně obsahu a seznamu použité literatury).

Text musí být napsán vhodným textovým editorem počítače po jedné straně bílého nelesklého papíru formátu A4 při respektování následující doporučené úpravy - písmo Times New Roman 12b; řádkování 1,5; okraje – horní, dolní – 2,5 cm, levý – 3 cm, pravý 2 cm. Fotografie, schémata, obrázky, tabulky musí být očíslovány a musí na ně být v textu poukázáno. Budou zařazeny průběžně v textu, pouze je-li to nezbytně nutné, jako přílohy (viz ad 10).

Odborná terminologie práce musí odpovídat platným normám. Všechny výpočty musí být přehledně uspořádány tak, aby každý odborník byl schopen přezkoušet jejich správnost. Matematické vzorce musí být číslovány (v kulatých závorkách). U vzorců, údajů a hodnot převzatých z odborné literatury nebo z praxe musí být uveden jejich pramen - u literatury citován číselným odkazem (v hranatých závorkách) na seznam použité literatury. Nedostatky ve způsobu vyjadřování, nedostatky gramatické, neopravené chyby v textu mohou snížit klasifikaci práce.

- ad 9) DP bude obsahovat alespoň 15 literárních odkazů, z toho nejméně 5 v některém ze světových jazyků. Seznam použité literatury se píše na zvláštním listě. Citaci literatury je nutno uvádět důsledně v souladu s ČSN ISO 690. Na práce uvedené v seznamu použité literatury musí být uveden odkaz v textu DP.
- ad 10) Přílohy budou obsahovat jen ty části (speciální výpočty, zdrojové texty programů aj.), které nelze vhodně včlenit do vlastní textové části např. z důvodu ztráty srozumitelnosti.

III.

Diplomovou práci student odevzdá ve dvou knihařsky svázaných vyhotoveních, pokud katedra garantující studijní obor neurčí jiný počet. Vnější desky budou označeny takto:

nahoře: *Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava*
Fakulta materiálově - technologická
Katedra

uprostřed: *DIPLOMOVÁ PRÁCE*

dole: *Rok* *Jméno a příjmení*

Kromě těchto dvou knihařsky svázaných výtisků odevzdá student kompletní práci také v elektronické formě do IS EDISON. Práce vložená v elektronické formě do IS EDISON se musí zcela shodovat s prací odevzdanou v tištěné formě. Po vložení DP do IS EDISON bude provedena její kontrola na plagiátorství.

IV.

Nesplnění výše uvedených zásad pro vypracování diplomové práce může být důvodem nepřijetí práce k obhajobě. O nepřijetí práce k obhajobě rozhoduje v tomto případě garant příslušného studijního oboru. Tyto zásady jsou závazné pro studenty všech studijních programů a forem magisterského, resp. navazujícího magisterského studia Fakulty materiálově – technologické, Vysoké školy báňské – Technické univerzity Ostrava od akademického roku 2018/2019.

Ostrava 12. 11. 2018


Prof. Ing. Jana Dobrovská, CSc.
děkanka Fakulty materiálově- technologické
VŠB-TU Ostrava

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- jsem byla seznámena s tím, že na mojí diplomové práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. – autorský zákon, zejména §35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního (§60 – školní dílo);
- беру на ве́домі, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB – TUO) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě diplomovou práci užít (§35 odst. 3);
- souhlasím s tím, že diplomová práce bude archivována v elektronické formě v databázi Ústřední knihovny VŠB – TUO a jeden výtisk bude uložen u vedoucí diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o diplomové práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB – TUO;
- bylo sjednáno, že s VŠB – TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu §12 odst. 4 autorského zákona;
- bylo sjednáno, že užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu užití mohu jen se souhlasem VŠB – TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB – TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- беру на ве́домі, že odevzdáváním své diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (Zákon o vysokých školách) bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Místopřísežně prohlašuji, že jsem celou diplomovou práci vypracovala samostatně.

V Ostravě... 23. 04 2019



Podpis Hana Vjatráková

ABSTRAKT

Cílem práce je porovnání klasických metod přípravy vzorků pro organickou analýzu buď s nově vyvinutými nebo optimalizovanými metodami přípravy vzorků, které využívají mikrovlnný reaktor před chromatografickými analytickými metodami. Modelově je vyvíjena metoda s dostatečnou extrakční účinností pro extrakci kapsaicinoidů z chilli koření, která by zároveň naplňovala principy zelené analytické chemie. Tato vyvinutá metoda posloužila jako základ pro optimalizaci rutinně používané metody pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU).

KLÍČOVÁ SLOVA

Extrakce, mikrovlnný reaktor, mikrovlnná extrakce, kapsaicin, kapsaicinoidy, PAU

ABSTRACT

The aim of the work is a comparison of classic sample preparation methods for organic analysis with newly developed and optimized methods using microwave reactor prior to chromatographic analysis. A model method for extraction of capsaicinoids from chillies is developed. The method should fulfill principles of green chemistry, too. Based on the new method, optimization process is applied to routine method for analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs).

KEY WORDS

Extraction, microwave reactor, microwave-assisted extraction, capsaicin, capsaicinoids, PAHs

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Pavlu Bučkovi, Ph.D, za odborné vedení, konzultace a cenné rady při sepisování mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Barboře Sokolové, Ph.D. za pomoc při zpracování výsledků analýz. A v neposlední řadě bych chtěla také poděkovat Ing. Janě Strakošové za přátelský přístup, zajištění instrumentálního zázemí a laboratorní pohody.

Tato práce vznikla za podpory projektu SP2018/38 „Termické zpracování odpadů a ochrana životního prostředí IV“.

OBSAH

1	ÚVOD.....	12
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	13
2.1	Příprava vzorků k analýze	13
2.2	Extrakce	14
2.2.1	Extrakce v Soxhletově extraktoru	15
2.2.2	Extrakce mikrovlnným zářením	16
2.2.3	Extrakce ultrazvukem.....	18
2.2.4	Moderní extrakční techniky	19
2.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	21
2.3.1	Historie	21
2.3.2	Základní pojmy HPLC	22
2.3.3	Instrumentace HPLC	22
2.3.4	Chromatografická data	24
2.4	Studované organické látky.....	26
2.4.1	Kapsaicin.....	26
2.4.2	Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)	29
3	PRAKTICKÁ ČÁST	33
3.1	Materiály.....	33
3.1.1	Použité biologické matrice	33
3.1.2	Použité chemikálie	35
3.1.3	Použité pomůcky a zařízení.....	35
3.2	Metody.....	36
3.2.1	Příprava vzorků pro HPLC analýzu - kapsaicinoidy.....	36
3.2.2	Příprava vzorků pro HPLC analýzu - PAU	39
3.2.3	HPLC analýza	39
4	VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUSE	44
4.1	Kapsaicinoidy	44
4.1.1	Výběr extrakčního činidla	44
4.1.2	Extrakční doba.....	45
4.2	Polycyklické aromatické uhlovodíky	47
4.2.1	Extrakční činidlo	47
4.2.2	Extrakční doba.....	48

4.3	Srovnání účinnosti klasické a nově použité metody	49
5	ZÁVĚR	51
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ	59
	SEZNAM OBRÁZKŮ	60
	SEZNAM TABULEK.....	61
	SEZNAM PŘÍLOH.....	62

1 ÚVOD

Postupy pro stopovou analýzu se vyznačují nutností izolovat a zakoncentrovat analyty, čehož se dosahuje zejména zpracováním poměrně velkého množství materiálu vzorku ve vztahu k množství hledaných látek. Na rozdíl od klasických metod přípravy, které obnášejí dlouhé zahřívání s velkými objemy činidel v malém množství vzorků, využívají procesy v mikrovlnných reaktorech vysoké teploty a tlaky v uzavřených nádobách ve větším množství paralelně zpracovávaných vzorků. Při dosažení obdobných výsledků dosahují řádově nižších časů nutných pro zpracování vzorků. Těchto postupů se využívá například při analýzách znečištění životního prostředí nebo při analýzách potravin.

Volba extrakční techniky ovlivňuje nejen výtěžnost, ale i kvalitu stanovení. I s ohledem na množství analyzovaného vzorku moderními přístroji se uplatňují zásady zelené chemie a u metod přípravy vzorků je patrná snaha o zmenšení objemu extrakčních rozpouštědel, finálního objemu extrahovaného vzorku a zkrácení času potřebného pro přípravu vzorku.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Pro stanovení stopového množství organických látek v biologickém materiálu je zapotřebí správné oddělení složek ze směsi. K tomuto účelu se využívá separačních neboli dělicích metod, které jsou založeny na principu rozdílného rozdělování jednotlivých látek ve směsi. V této práci byly využity hned dvě separační operace, a to při přípravě vzorků biologického materiálu (extrakce) a analýze již zakoncentrovaných analytů (chromatografie).

2.1 Příprava vzorků k analýze

Většina analytických zařízení není konstruována pro práci se vzorky v původní formě. Tyto vzorky jsou často nevhodné pro přímou analýzu kvůli nevhodné koncentraci analytů (přílišné zředění) nebo neslučitelnosti s postupy provozu přístroje. [1] v oblasti stopové analýzy se vzorky analyzují ve formě roztoků, při jejichž přípravě je nutné analyty z původní matrice převést do kapalné fáze a izolovat (extrakcí nebo mineralizací), případně i zakoncentrovat. Pro chromatografické metody může příprava vzorku obsahovat i krok filtrace, aby se zamezilo riziku ucpání kapilár. [1], [2]

Příprava a zpracování vzorků k analýze bývá považována za jeden z největších zdrojů chyb celého analytického procesu, a to na základě mnoha prováděných analytických operací (extrakce, destilace, filtrace a další). Navíc použitím klasických extrakcí rozpouštědlem pro zakoncentrování analytů lze značně přispívat k znečištění životního prostředí. Nejžádanější by byla přímá analytická metoda, která by analyty stanovovala v původním vzorku. Hlavním úskalím přímých metod bývá jejich použitelnost pouze pro vzorky s relativně čistými maticemi. [2]

Pro snížení zatížení životního prostředí a efektivitu přípravy vzorků existuje mnoho přístupů vedoucích k tzv. „zelené“ přípravě vzorků. Tyto přístupy lze rozdělit do několika bodů:

- redukce (v nejlepším případě eliminace) množství rozpouštědel a činidel,
- zmenšení analytických zařízení a redukce počtu analytických operací,
- integrace různých postupů a automatizace v přípravě vzorků,
- řádné utěsnění všech nádob používaných při přípravě vzorků,
- obnova rozpouštědel a opětovné použití,
- použití šetrnějších médií (iontové kapaliny, nadkritické tekutiny přehřátá voda),
- zvýšená teplota, zvýšený tlak, mikrovlnná popř. ultrazvuková energie). [2]

2.2 Extrakce

Principem extrakce je rozdělení složek ze směsi látek v kapalně či tuhé fázi do jiné kapalně fáze na základě různé rozpustnosti v použitých rozpouštědlech. [3] Extrakční proces je nejdůležitějším krokem úpravy tuhých a kapalných vzorků, sloužící k zakoncentrování nebo přečištění vzorku, případně k izolaci některých složek ze složitější matrice. [15] Je velmi výhodná pro izolaci tepelně nestálých látek, protože se může provádět za laboratorní teploty i za chladu. [4] Extrakce se dělí:

a) podle fází

kapalina – kapalina: přechod rozpuštěné látky z jedné kapalně fáze do druhé. Důležitou podmínkou těchto dvou kapalných fází je vzájemná nemísitelnost (v laboratorní praxi bývá nejčastěji jedním rozpouštědlem voda, zatímco druhé rozpouštědlo je organické). Používá se k získávání požadované látky z roztoku nebo k odstranění nežádoucích nečistot z rozpouštědla. [3], [4]

pevná fáze – kapalina: používá se velmi často v biologii, biochemii, organické a anorganické chemii. Získávají se takto např. alkaloidy, hormony a barviva. Nejjednodušší extrakce, při níž se pevná látka rozmíchá do rozpouštědla a následně se zfiltruje (macerace). Ovšem nejčastěji se pevné organické materiály extrahují za tepla vhodnými organickými rozpouštědly (digesce). [3]

plyn – kapalina: nejčastěji se používá v plynové chromatografii pro nakoncentrování těkavých složek vzorku.

b) podle způsobu provedení

jednostupňová (statická): mezi fázemi dochází k ustanovení jedné rovnováhy. Příkladem je roztřepání v dělicí nálevce.

mnohostupňová (diskontinuální): ustavení rovnováhy se mnohokrát opakuje v oddělených krocích. Příkladem je několikanásobné roztřepávání v dělicí nálevce.

opakovaná extrakce (kontinuální): fáze jsou při protiproudém pohybu v neustálém styku. Příkladem je extrakce v Soxhletově extraktoru. [3]

c) *podle charakteru extrahovaných látek*

- **extrakce organických látek**
- **extrakce kovových chelátů**
- **extrakce iontových asociátů**

Obecně platí, že opakovaná extrakce několika menšími dávkami rozpouštědla je účinnější než extrakce jednostupňová celým množstvím rozpouštědla. Účinnost extrakce potom závisí na rozdílu rozpustnosti oddělované látky v obou použitých rozpouštědlech. [4]

2.2.1 Extrakce v Soxhletově extraktoru

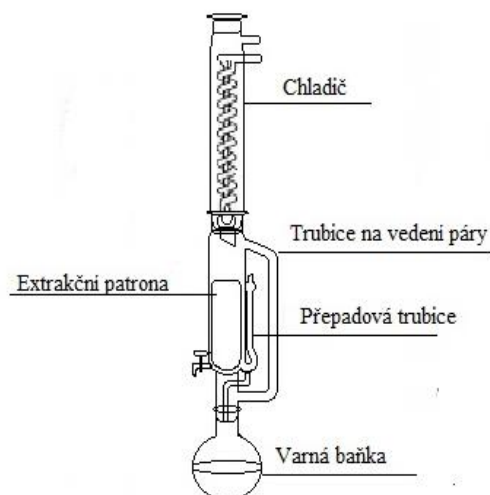
Extrakce v Soxhletově extraktoru spadá mezi klasické extrakční techniky, přičemž extraktor je kus laboratorního zařízení vynalezeného v roce 1879 Franz von Soxhletem [6] Původně byl navržen pro extrakce lipidů z pevného materiálu, což nasvědčuje tomu, že je tato technika využívána pro extrakci látek z tuhých matric. [2], [6] Tento extrakční systém byl až do rozvoje moderních extrakčních technik v osmdesátých letech dvacátého století nejvíce využívanou extrakční technikou. [2] Ačkoliv v dnešní době již tuto klasickou extrakční metodu nahradily techniky modernější s využitím pomocných energií a zautomatizováním, stále je extrakce v Soxhletově extraktoru dodnes využívána jako srovnávací metoda pro jiné extrakční techniky. [1]

Soxhletův extraktor (viz Obrázek 1) se skládá ze tří hlavních částí:

Varná baňka – v níž se zahřívá rozpouštědlo k bodu varu, a kde následně dochází ke koncentrování netěkavé složky vyextrahované ze vzorku. Podmínka úspěšné extrakce je stabilita izolované látky při teplotě varu daného extrakčního rozpouštědla. [2]

Soxhletův extrakční nástavec – zde se umísťuje extrakční patrona se vzorkem, na který neustále skapává kondenzované rozpouštědlo z chladiče a vymývá rozpustné sloučeniny z tuhé matrice vzorku. Extrakt je poté pomocí přepadové trubice vrácen do varné baňky, odkud se následně odpařuje čisté rozpouštědlo a tento proces se opakuje, dokud nejsou požadované analyty ze vzorku vyextrahovány v dostatečném množství. [2], [5]

Chladič – na něm dochází ke kondenzaci par rozpouštědla, které následně skapává do patrony se vzorkem. [5] Patrona může být zhotovená buď ze skla, přičemž je výhodou opakovatelnosti použití, nebo z papíru, kde je výhodou cena patrony. [7]



Obrázek 1 - Soxhletův extraktor [autor]

Výhodou této extrakce je minimalizování nároku na obsluhu extraktoru, dále nízká cena základního vybavení a neustálé extrahování vzorku čistým rozpouštědlem až do dosažení rovnováhy. Naopak nevýhodou je časová náročnost extrakce (až 48 hod) a velká spotřeba organických rozpouštědel. V případě nízkých obsahů analytů ve vzorku je potřeba jistou část rozpouštědla odstranit a extrakt tak zakonzentrovat, což vyžaduje používat rozpouštědla o vysoké čistotě a s tím souvisí jejich vysoká cena.

Metoda extrakce v konvenčním Soxhletově extraktoru s jeho hlavními výhodami byla využita jako referenční metoda pro nově vyvíjející se techniky. Kde je cílem potlačit některé nevýhody a zachovat stávající výhody. [1], [2], [5]

2.2.2 Extrakce mikrovlnným zářením

Mikrovlnná extrakce (MAE – *Microwave Assisted Extraction*) patří mezi tzv. asistované extrakce, která je jednou z nejpoužívanějších alternativních extrakčních metod v dnešní době. [8] Oproti běžné extrakce kapalinou (např. Soxhletova extrakce), použití mikrovlnné energie pro zahřátí extrakčního rozpouštědla se vzorkem vede ke snížení extrakční doby a taktéž ke snížení spotřeby organického rozpouštědla, tudíž se zařazuje mezi již zmíněné „zelené“ extrakční techniky. [9] Mezi parametry, které lze optimalizovat při vývoji MAE patří: typ rozpouštědla, charakter matrice, teplota, doba extrakce a aplikovaný mikrovlnný výkon (uváděný ve W_{attech}). [2], [9]

Volba rozpouštědla pro MAE závisí na jejich schopnosti absorbovat mikrovlnnou energii. Schopnost specifického rozpouštědla nebo materiálu přeměnit mikrovlnnou energii na

teplo je dáno tzv. tangentou ztráty (δ), čím vyšší je hodnota $\tan \delta$, tím lepší je rozpouštědlo. Rozpouštědla jsou klasifikována jako vysoce absorbující (ethanol, methanol, dimethylsulfoxid), středně absorbující (1,2-dichlorbenzen, kyselina octová, dimethylfumarát, voda) a s nízkou absorbcí (chloroform, acetonitril, dichlormethan, toluen). [49]

Základní komponenty mikrovlnného systému jsou mikrovlnný generátor, vlnovod, rezonanční dutina a napájení. Mikrovlnný generátor, nazývaný magnetron byl poprvé použit v roce 1921 (A.W. Hull). Magnetron je ve své podstatě válcovou diodou v axiálním magnetickém poli s kruhem dutin, které působí jako anodová struktura. Tyto dutiny rezonují a jsou zdrojem oscilací mikrovlnné energie. [10] Magnetrony byly široce rozvinuty od čtyřicátých let minulého století hlavně pro pozemní a družicovou komunikaci. Poté Percy Spencer v roce 1946 objevil funkci mikrovln jako zdroj tepla a od roku 1967 jsou dostupné mikrovlnné trouby pro domácí použití. [2], [10] Mikrovlnná extrakce jako taková byla poprvé provedena v roce 1986 Ganzlerem a kolektivem.

MAE používá mikrovlnnou energii k ohřevu rozpouštědel, která jsou v kontaktu s pevnými nebo kapalnými vzorky, a k převedení požadovaných sloučenin z matrice do rozpouštědla. [11] Mikrovlnné záření proniká do materiálu a způsobuje otáčení dipólového momentu molekul rozpouštědla, dochází k tvorbě tepla, přičemž se ohřívá celý materiál do hloubky. Zahříváním se zvyšuje migrační rychlost rozpuštěných iontů a tím průnik rozpouštědla do tuhé matrice. [7], [10] Extrakce může probíhat v uzavřeném nebo otevřeném systému.

Uzavřený systém (za zvýšeného tlaku) – extrakce se provádí v uzavřené nádobě, která neabsorbuje mikrovlny, naplněné extrakčním rozpouštědlem (s vysokou dielektrickou konstantou), které mikrovlny absorbují (čím více, tím lépe). Ohřevem dochází k zahřátí směsi vzorku s rozpouštědlem a tím ke zvýšení tlaku v nádobce. Zvýšením teploty a tlaku se zvýší extrakční účinnost a permeabilita rozpouštědla. [10], [12]

Otevřený systém (za atmosférického tlaku) – extrakce probíhá v rozpouštědle (s nízkou dielektrickou konstantou), které mikrovlny zcela neabsorbují a v otevřené nádobce, která taktéž mikrovlny neabsorbují. V tomto případě absorbují mikrovlny vzorek sám (obsahuje absorbující složky, jako je např. voda). Maximální extrakční teplota je dána bodem varu rozpouštědla. [2], [12]

Hlavními výhodami MAE je úspora použitého rozpouštědla, zkrácení extrakčního času a v neposlední řadě snížení množství použitého vzorku.

2.2.3 Extrakce ultrazvukem

Metoda ultrazvukové extrakce (USE – *Ultrasound Extraction*) se taktéž řadí mezi moderní asistované extrakce, která je pro svou extrakční účinnost společně s kratším extrakčním časem ve srovnání s klasickými metodami velmi atraktivní. [14]

Ultrazvuk se skládá z mechanických vln, které pro svůj účinek k šíření potřebují elastický prostředek. Rozdíl mezi zvukem a ultrazvukem je frekvence vlny, přičemž zvukové vlny jsou v rozsahu slyšitelnosti (16 Hz až 20 kHz), zatímco ultrazvuk má frekvence nad slyšitelnosti lidského ucha (20kHz až 10MHz). [13] Pro účinky ultrazvuku při šíření jsou klíčové kritéria jako vlastnosti prostředí, intenzita a frekvence kmitů, typ extrakčního rozpouštědla a v neposlední řadě pracovní podmínky (tlak, teplota). [14] Vlivem působení ultrazvukové vibrace dochází k dokonalému kontaktu vzorku s rozpouštědlem, kde vlivem ultrazvukové energie dochází k narušení/rozpadu vzorku, což má za následek lepší průnik rozpouštědla do vzorku a tím snadnější uvolnění extrahovaných látek. [2], [14] Společně s účinkem vysoké teploty (zvyšuje rozpustnost a difuzivitu látek) a vysokého tlaku (zvyšuje penetrační sílu rozpouštědla) lze dosáhnout lepší výtěžnosti analytů a zkrácení extrakční doby. [2] Důležitým jevem je kavitace, což je množina fyzikálních jevů spojená se vznikem, růstem a zánikem bublin v kapalině. Kavitace vzniká v proudících kapalinách nebo při pohlcení ultrazvukových vln v kapalině v místech, kde dochází k náhlým tlakovým změnám. [14]

Ultrazvuk může být v analytické chemii aplikován dvěma způsoby, a to přímou metodou na vzorek pomocí sondy (Obrázek 3), nebo nepřímou přes stěnu nádoby pomocí vodní lázně (viz Obrázek 2).

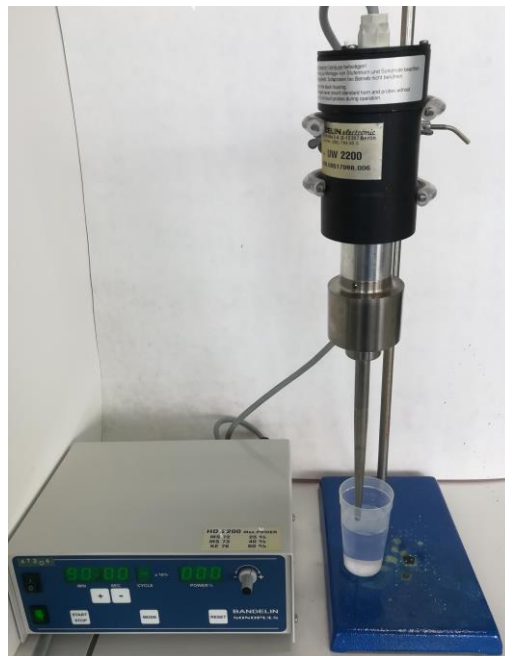
Ultrazvuková lázeň – přenáší vysokoenergetické a vysokofrekvenční zvukové vlny do nádoby naplněné tekutinou (obvykle vodou). Klasická lázeň pracuje pouze s jednou frekvencí (40 kHz) a může být dodávána s regulací teploty. V současné době existují různé typy lázní opatřené více frekvenčními jednotkami, které pracují současně s ultrazvukovými měniči s různými frekvencemi. [13] Vysílač vln je obvykle umístěn ve středu lázně, přičemž kavitační energie uvnitř lázně má proměnlivou intenzitu, tím dochází ke ztrátám ultrazvukové energie působící na vzorek. Hlavní příčinou ztrát může být dáno materiálem a tloušťkou stěny nádoby se vzorkem. [2] Konstantní výkon a automatické řízení kmitočtu zajišťují optimální rozložení ultrazvukové energie. [13]

Ultrazvuková sonda – sonda je ponořena přímo do roztoku se vzorkem a poskytuje ultrazvukový výkon, který je přinejmenším 100krát větší než výkon dodávaný v lázni,

přičemž doba sonikace je obvykle 5 minut nebo méně. Sonda je výkonný systém pro extrakci pevných látek v kapalině. Řízení intenzity sond umožňuje, aby ultrazvukové vibrace na špičce sondy byly nastaveny na libovolnou požadovanou úroveň. Pro dosažení kavitace není žádoucí využívat vysoké intenzity, jelikož se sonda rychle kazí. Dalším faktorem, který musí být kontrolován, je teplota. Jak je ultrazvuk dodáván do roztoku, je dosaženo pomalého, ale konstantního nárůstu teploty, a v určitém okamžiku dochází k určitým fyzikálním změnám kapalného média tak, že se sonda může odpojit a nemusí dojít k žádné kavitaci. [13]



Obrázek 2 – Ultrazvuková lázeň [autor]



Obrázek 3 – Ultrazvuková sonda [autor]

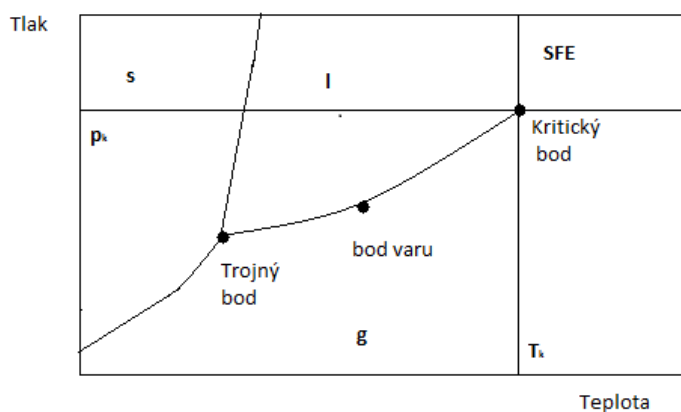
2.2.4 Moderní extrakční techniky

Ve většině klasických postupů se využívá rychlá a výkonná přístrojová technika při závěrečné separaci a detekci analytů, ovšem naproti tomu přípravy vzorků bývají časově náročné a velmi často manuálními metodami, které velmi zpomalují celkový analytický proces. V posledních desetiletích, dle publikací, snaha je snaha o přizpůsobení stávajících metod a vývoj nových technologií pro úsporu času, chemikálií, snížení pořizovacích a provozních nákladů, zlepšení celkové výkonnosti a v neposlední řadě zjednodušení celého analytického procesu. [16] V následujících odstavcích budou představeny některé další moderní extrakční techniky, které izolují organické látky z tuhých vzorků.

Extrakce nadkritickými tekutinami

Extrakce nadkritickými tekutinami (SFE – Supercritical Fluid Extraction) je jedna z moderních technik, která výrazně redukuje spotřebu organických rozpouštědel. [16] Metoda využívá některých vlastností látek v nadkritickém stavu (nadkritických tekutin), což je stav, při kterém mizí fázové rozhraní mezi kapalnou a plynnou fází při zvyšování teploty a tlaku nad jejich kritický bod (viz Obrázek 4). [14] Tekutina v nadkritickém stavu má viskozitu přibližující se plynům a rozpouštěcí vlastnosti blízké se kapalinám. [7]

Tato technika není v pravém smyslu extrakcí v systému kapalina – tuhá látka, jelikož ve většině případů jako extrakční médium slouží CO_2 v nadkritických podmínkách, který rychle proniká přes vzorek. Vzorek musí být suchý, aby se zabránilo tvorbě emulzí. [14] Po ukončení extrakce se extrakt zavádí pod hladinu vhodného rozpouštědla nebo na tuhý sorbent, čímž CO_2 vytěká do atmosféry. Nevýhodou je nízká polarita oxidu uhličitého, což omezuje použití SFE pro nepolární analyty. [16]



Obrázek 4 - p-T fázový diagram čisté látky [autor]

Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem

Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PLE – *Pressurized Liquid Extraction*, PFE – *Pressurized Fluid Extraction*) je vysoce účinná metoda pro extrakci z tuhých a polotuhých matric. Využívá vlastnosti rozpouštědel při teplotách nad atmosférickým bodem varu, které jsou působením vysokého pracovního tlaku udržované v kapalném stavu. [16] Extrakce je velice podobná extrakci nadkritickou tekutinou, ačkoliv rozpouštědlo je během procesu pod kritickými podmínkami. [12] Extrakčním médiem může být jakékoliv polární i nepolární rozpouštědlo, případně směs rozpouštědel. Zvýšením teploty se sníží viskozita a povrchové napětí, tím se zvýší rychlost difúze, rozpustnost a přenos hmoty. Tyto změny napomáhají lepšímu kontaktu analytu s rozpouštědlem, což vede k lepšímu výtěžku extrakce. [16]

Hlavními výhodami PFE je vysoký extrakční výtěžek ve srovnání s klasickými metodami, kratší doba extrakce a snížená spotřeba rozpouštědla. Naproti tomu vysoká extrakční teplota vylučuje použití této techniky pro extrakci termolabilních organických látek. [17] Hojné využití má pro extrakci lipidů z potravin či biologických tkání. [7]

2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

V následující kapitole budou popsány základní pojmy, principy a instrumentace týkající se analytické metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*). HPLC je technika sloužící k separaci složek vzorku na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází, přičemž mobilní fáze je přiváděna do systému pomocí čerpadla za vysokého tlaku. [18]

2.3.1 Historie

Kapalinová chromatografie byla definována již počátkem 20. století prací ruského botanika Michajlem S. Cvětem, jehož studie se zaměřovala na separaci listových pigmentů extrahovaných pomocí rozpouštědla ve sloupci naplněném sorbentem. [19] Při svých pokusech naplnil otevřenou skleněnou kolonu uhličitánem vápenatým (prášková křída), extraktem z homogenizovaných listů rostlin a nakonec přidal čisté rozpouštědlo. Když vzorek díky gravitaci prošel kolonou, bylo možné vidět různě, barevně rozdělené segmenty. [20] Tyto oddělené, různě zbarvené proužky spojoval s různými částicemi, které byly původně obsaženy ve vzorku. Metoda byla nazvána chromatografie podle řeckého slova chroma, což znamená barva. [19]

Cvětova chromatografie byla široce používána po celá desetiletí, ale to neznamená, že nový vývoj v chromatografii se zastavil v roce 1903. Ve čtyřicátých letech dva vědci Archer J. Martin a Richard M. Synge učinili významný průlom v oblasti chromatografie. Vyvinuli nový přístup k chromatografii, který používal dvě kapalně fáze místo jedné. Tento přístup pomohl oddělit sloučeniny s různými rozdělovacími koeficienty a položil tak základy pro vývoj vysoce výkonné kapalinové chromatografie. [20]

Během sedmdesátých let pomohly nové průlomy v chromatografické technologii ještě více vylepšit tuto populární techniku. V těch dobách již technicky bylo možné vytvořit sorbent s menšími rozměry částic, což mělo za následek zvýšení průtoku mobilní fáze. [19] Následně musely být k systému přidány pumpy, které napomáhaly snadnějšímu průchodu

kapalné fáze a sloučeninám přes stacionární fázi, čímž také docházelo k rychlejší separaci. [21] Kvůli navýšení tlaku byla metoda následně pojmenována vysokotlakou chromatografií. [18]

2.3.2 Základní pojmy HPLC

Kapalinová chromatografie je analytická separační metoda. Separace složek vzorku je založena na opakovaném rychlém ustavování rovnovážné distribuce jednotlivých látek mezi náplní kolony (**stacionární fáze**) a okolním kapalným médiem (**mobilní fáze**). Kombinaci použité stacionární a mobilní fáze označujeme jako chromatografický systém. [22] Mobilní fáze protéká kolonou a unáší s sebou složky vzorku, které interagují se stacionární fází. [23] Rozdíly v distribuci jednotlivých složek (**chromatografická selektivita**) mezi fázemi vedou k tomu, že se složky pohybují různými rychlostmi a vystupují z kolony v různém čase, což se na detektoru (**chromatogramu**) projeví vzájemně oddělenými elučními křivkami (**píky**). Kvalita separace je dána jak chromatografickou selektivitou, tak i účinností kolony. [22]

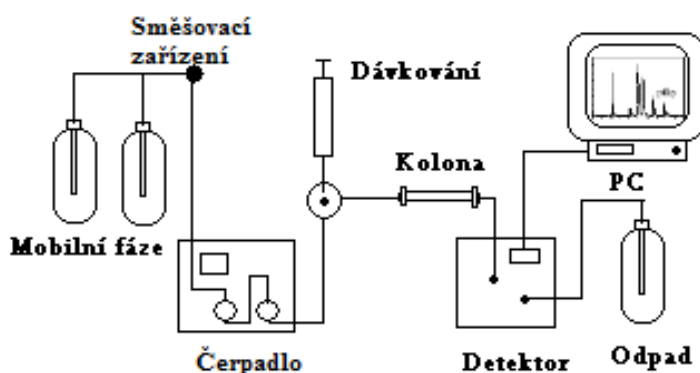
Podle interakcí, které v chromatografických systémech převažují, se HPLC dělí na:

1. **Chromatografii v systému s normálními fázemi (adsorpční chromatografie)** – polarita stacionární fáze je větší než polarita mobilní fáze. Polární stacionární fáze mohou být anorganické polární adsorbenty (silikagel, oxid hlinitý nebo oxid zirkoničitý) nebo adsorbenty, jejichž polarita je snížena chemickou modifikací. Složky se separují na základě různé schopnosti se poutat na povrch stacionární fáze.
2. **Chromatografii v systému s obrácenými fázemi (rozdělovací chromatografie)** – polarita mobilní fáze je větší oproti stacionární fázi. Stacionární fáze jsou nepolární či mírně polární (silikagel s chemicky vázanými alkylovými, nitrilovými skupinami). O separaci rozhoduje odlišná rozpustnost složek vzorku ve stacionární a mobilní fázi.
3. **Chromatografie iontové výměny** - kdy dochází k separaci iontů vzorku na základě různé velké elektrostatické přitažlivé síly stacionární fáze (iontoměnič).
4. **Chromatografie permeační gelová** – separace složek se uskutečňuje na základě velikosti částic, při průchodu pórovitou stacionární fází (gelem). [22], [24]

2.3.3 Instrumentace HPLC

HPLC pracuje v kontinuálním uspořádání, většinou výhradně eluční metodou, kde čerpadlo dávkuje ze zásobních lahví mobilní fázi při stálém průtoku kolonou. [25] Zařízení

(chromatograf) pracuje s 2 – 30 cm dlouhými kolonami, s vnitřním průměrem 0,1 – 6 mm, plněnými sorbentem s jemnými částicemi s úzkou distribucí velikostí (střední průměr 1 – 10 μm), na nichž se dosahuje dosti vysoké účinnosti až 100 000 teoretických pater. [22], [25] K účinné separaci se používají jemná zrníčka sorbentu, která kladou prostupující kapalině značný odpor. Proto je nutné pracovat za vysokého tlaku až 40 MPa (400 bar). [25], [26] Vzorek se dávkuje přímo do protékající mobilní fáze na vstupu kolony. Eluát z kolony prochází detektorem, jehož signál (odezva, úměrná koncentraci či hmotnosti separovaných látek) se zpracovávají počítačem, nebo elektronickým integrátorem, který se dnes již nevyužívá. [25] Zjednodušené schéma HPLC je znázorněno na Obrázku 5.



Obrázek 5 - Zjednodušené schéma HPLC [autor]

Dávkovací zařízení – vzorek může být zaveden dvěma způsoby, injektory injekční stříkačky nebo dávkovacími ventily se smyčkou naplněnou vzorkem. Pokud je použito injekční zařízení, musí být zhotoveno z inertních materiálů. Dávkovací zařízení může být ovládáno ručně nebo automaticky, přičemž automatický dávkovač je vybaven zásobníky s vialkami, obsahující řadu vzorků. [23], [25], [26]

Čerpadlo – musí být konstruováno z materiálu odolných vůči chemické korozi a schopno dávkovat plynule bez kolísání průtoku i při vysokých pracovních tlacích. Používají se čerpadla s malým objemem pístních komor (10 – 400 μl), protože umožňují rychlou výměnu mobilní fáze, která se střídavě nasává ze zásobníku a vytlačuje se na chromatografickou kolonu. [25], [26]

Směšovací zařízení – naprogramováním lze s využitím zásobníků různých kapalin připravovat směs stálého složení nebo měnit složení finální mobilní fáze v průběhu separace (gradientová eluce). [26]

Kolony – používají se pouze náplňové. Nejčastěji jsou to rovné bezešvé trubice vyrobené z nerezové oceli, případně tvrzeného skla, titanu nebo pevného polymeru, opatřené na koncích fritami, které zadržují částice náplně. Rozměry kolon se liší dle účelu použití. Pro většinu rutinních analytických separací slouží kolony o délce 10 – 25 cm a vnitřním průměru 3 - 4,6 mm, plněné částicemi o velikosti do 10 μm . [25] Kratší kolony (3 – 6 cm) stejného průměru umožňují dosáhnout jednodušší separaci během pár minut, ovšem stačí-li účinnost do 4000 teoretických pater. Jsou levnější, spotřebují malé množství mobilní fáze a zlepšují produktivitu v laboratoři. [23], [26]

Detektor – by měl být selektivní pro analyty a málo citlivý na mobilní fázi. Průtočná cela detektoru, v níž je umístěn vzorek, musí udržet těsnost a snést vysoký tlak. [26] Nejčastěji se používají spektrofotometrické detektory, pracující v ultrafialové, případně i ve viditelné oblasti elektromagnetického záření (190 – 800 nm). V daném čase detektor poskytuje UV spektra (závislost absorpance na vlnové délce) pro každý pík na chromatogramu, což umožňuje identifikaci jednotlivých látek (př. detektory s fotodiodovým polem). [25] Dále mohou být zmíněny další detektory pro HPLC metodu, jako jsou fluorimetrické (využívá fluorescenci látek), refraktometrické (měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a mobilní fáze), elektrochemické (pro složky oxidovatelné nebo redukovatelné na polarizované elektrodě), infračervené (absorbce záření o vlnové délce 0,78 – 1000 μm), vodivostní, amperometrický nebo hmotnostní spektrometr. [26]

2.3.4 Chromatografická data

Retenční (eluční) čas, t_R , je charakteristická veličina pro každou separovanou složku v daném systému. Je to doba pobytu látky v chromatografickém systému od nástřiku vzorku do dosažení maxima vrcholu píku (eluční křivky). **Retenční (eluční) objem**, V_R , je objem mobilní fáze, který proteče za daný retenční čas. [27]

Vztah mezi těmito charakteristikami je dán rovnicí:

$$V_R = F_m \cdot t_R \quad (\text{Rovnice 1 [27]})$$

kde F_m je objemová průtoková rychlost mobilní fáze udávaná v cm^3/s . F_m je rovna součinu lineární rychlosti mobilní fáze (cm/s) a průřezu kolony (cm^2). [27]

Složky vzorku lze identifikovat na základě shody jejich retenčních (elučních) časů s retenčními časy standardů, zatímco obsah složek ve vzorku lze získat na základě výšek a ploch píků. [25]

Retenční faktor, k , udává poměr doby, kterou látka stráví ve stacionární fázi (čistý retenční čas, t'_R) a v mobilní fázi při migraci kolonou (mrtvý eluční čas kolony, t_0). Je roven poměru látkového množství analytu ve stacionární (n_s) a v mobilní (n_m) fázi v koloně, je přímo úměrný **distribuční konstantě** látky, K_D , který vyjadřuje poměr koncentrací látky ve stacionární (c_s) a mobilní fázi (c_m) a určuje **relativní rychlost migrace** látky kolonou, u_i , vůči **rychlosti toku mobilní fáze**, u . Retenční faktor lze vypočítat z retenčního času. [25]

$$k = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{u_i}{u} - 1 = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{n_s}{n_m} = \frac{c_s}{c_m} \cdot \frac{V_s}{V_m} = K_D \phi \quad (\text{Rovnice 2, [25]})$$

ϕ je fázový poměr objemu stacionární fáze, V_s , a objemu mobilní fáze, V_m , v koloně.

Účinnost kolony se určuje kvalitou chromatografické separace složky ze vzorku. Účinnost je dána počtem teoretických pater, N , což je pomyslná část kolony, ve které dochází k ustavení rovnováhy mezi mobilní a stacionární fází. [26] Délka této části nazývaná **výškový ekvivalent teoretického patra**, H , závisí na délce kolony, L , a vypočítá se následujícím vztahem:

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Rovnice 3, [26]})$$

Počet teoretických pater lze vyhodnotit z retenčního času, t_R , a z šířky píku v základně, w_t , respektive v polovině jeho výšky, $w_{1/2}$, na chromatografickém záznamu dle vztahu [27]:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_t} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{t,1/2}} \right)^2 \quad (\text{Rovnice 4, [25]})$$

2.4 Studované organické látky

V následující kapitole budou představeny organické látky, které byly v této práci stanovovány.

2.4.1 Kapsaicin

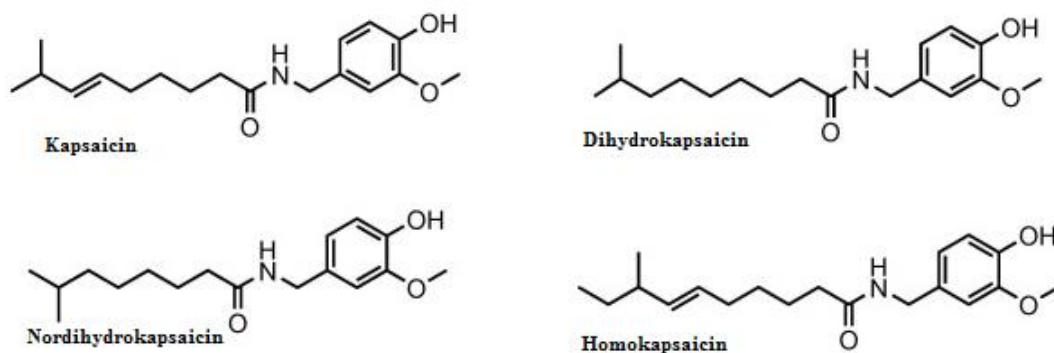
Chilli koření, kousky papriček rodu *Capsicum* je známo po celém světě jako lahodné koření významné pro svou pikantní chuť. Pálivost této rostliny je způsobena skupinou alkaloidů strukturně podobných kapsaicinu a podle něj nazývané **kapsaicinoidy**. [28]

Kapsaicinoidy jsou alkaloidy bazické povahy, které patří mezi sekundární metabolity rostlin rodu *Capsicum*. Přírodně se v chilli papričkách vyskytuje pět kapsaicinoidů, ovšem největší zastoupení mají kapsaicin a dihydrokapsaicin (cca 90%, z toho kapsaicin až 70%). Mezi další alkaloidy v chilli papričkách se řadí nordihydrokapsaicin, homokapsaicin, homodihydrokapsaicin, existuje i syntetický alkaloid nonivamid.[29]

Kapsaicin je organická sloučenina s chemickým vzorcem: $C_{18}H_{27}NO_3$ a molekulovou hmotností 305,41 g/mol (viz Obrázek 6). Je hlavním alkaloidem papriček rodu *Capsicum*. [30]

Kapsaicin jako čistou látku v krystalické formě poprvé izoloval z pálivých paprik v roce 1846 J. C. Tresh. Po izolaci byla v témž roce sloučenina pojmenována kapsaicin, ale její chemická struktura byla určena E. K. Nelsonem v roce 1919. Kompletní chemická syntéza 8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamid byla popsána v roce 1930 společností Spath & Darling. V 60. letech minulého století japonští vědci identifikovali v extraktech z paprik z rodu *Capsicum* další látky s podobnými chemickými a farmakologickými vlastnostmi, které byly pojmenovány „kapsaicinoidy“. [32]

Čistý kapsaicin i jeho deriváty jsou krystalické látky za laboratorních podmínek špatně rozpustné ve vodě, zato však dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a tucích. Jsou bezbarvé, bez zápachu a mají antimikrobiální a protinádorové účinky. V kontaktu se sliznicí vyvolávají nepříjemné pálení spojené až s bolestí. [29] Kapsaicin se váže k vaniloidním receptorům typu 1, které detekují bolestivé podněty na periferních terminálech specializovaných senzorických neuronů nazývaných nociceptory. Tyto neurony s malým průměrem přenášejí informaci do centrálního nervového systému a vyvolávají vnímání bolesti vyvolané teplem. [48]



Obrázek 6 - Vzorce vybraných kapsacinoidů [30]

Pálivost

Celkový obsah kapsaicinoidů v chilli papričkách je obvykle vyjádřen součtem koncentrací kapsaicinoidů tzv. pálivostí. Nejrozšířenějším měřítkem pálivosti chilli papriček je „Scovilleova stupnice“ podle svého vynálezce Wilbura Scoville, který v roce 1912 vytvořil organoleptický test. Dobrovolníci ochutnávají sériově zředěné extrakty z definovaného množství chilli a stupeň ředění se převádí do Scovillových tepelných jednotek (Scoville Heat Units - SHU). Měřítka zůstává populární, ačkoliv je dosti nespolehlivé a subjektivní. V dnešní době byl organoleptický test nahrazen chromatografickým stanovením kapsaicinoidů a přepočtem. [30], [31]

Na stupnici pálivosti odpovídá 16 jednotek SHU obsahu 1 µg kapsaicinoidů na 1 gram sušiny. Čistý kapsaicin má 16 000 000 SHU, čistý dihydrokapsaicin 15 000 000 SHU, ostatní kapsaicinoidy mají pálivost menší než 10 000 000 SHU. [29]

Stanovení

Kapsaicinoidy se stanovují pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo plynové chromatografie (GC). Pro obě metody lze použít detekci hmotnostním spektrometrem (MS), Detektor pro HPLC je většinou fluorescenční (FLD), případně UV/VIS spektrometr. [33] Pro přípravu vzorku k analýze se kapsaicinoidy extrahují různými rozpouštědly, jako jsou ethanol, methanol, acetonitril, hexan, aceton či chloroform. [36]

Bylo již studováno mnoho technik pro extrakci kapsaicinoidů z papriček, jako je macerace, magnetické míchání, Soxhletova extrakce, extrakce pomocí ultrazvuku, extrakce pomocí nadkritických kapalin aj. Na základě poptávky po metodě, která umožní snížení spotřeby rozpouštědla, automatizaci a zkrácení doby extrakce, vydali v roce 2006 Barbera a kolektiv studii, ve které extrahovali kapsaicinoidy z papriček pomocí mikrovln (MAE). [34]

Pro extrakci v mikrovlnném reaktoru byly shledány jako nejlepší tyto podmínky: teplota - 125 °C, rozpouštědlo – 25 ml 100% ethanolu, navážka vzorku – 0,5 g a doba extrakce – 5 min. Takto připravený vzorek byl analyzován HPLC s fluorescenční detekcí. [34]

Jiný postup stanovení kapsaicinoidů dle oficiální AOAC metody 995.03 spočívá v navážení 25 g vzorku papriky, která se vloží do 500 ml zábrusové baňky, přidá se 200 ml ethanolu a extrahuje se pod zpětným chladičem cca 5 hodin. Poté se extrakt zfiltruje přes 0,45 µm stříkačkový filtr do vialky a použije se pro HPLC analýzu s UV/VIS detekcí při vlnové délce 280 nm. [37]

Daniel Kremr a spol., z univerzity v Pardubicích, vyvinuli metodu založenou na extrakci papriček podkritickou vodou (PHWE), při které je jako extrakční činidlo používaná přehřátá voda za vysokého tlaku. Vzorek, jehož navážka je 0,1 g, se extrahuje dvoustupňově při teplotě 200°C a tlaku 210 bar po dobu 20 a 10 min. Poté jsou extrakty zchlazeny na laboratorní teplotu, doplněny mineralizovanou vodou na 50 ml a takto připraveny k analýze pomocí HPLC s hmotnostním spektrometrem. [29]

Za zmínku také stojí studie extrahování kapsaicinoidů pomocí ultrazvukové extrakce, jejíž autoři shledali optimálními tyto podmínky: rozpouštědlo – 10 ml acetonu, teplota extrakce – 25 °C, doba trvání extrakce 40 minut. [35]

Jak již bylo zmíněno v dnešní době je publikováno mnoho článků a studií v nichž je hlavním zájmem optimalizovat metody stanovení kapsaicinoidů z rostlinné matrice tak, aby byly více šetrné k životnímu prostředí a zapadaly tak do zásad zelené analytické chemie.

2.4.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU)

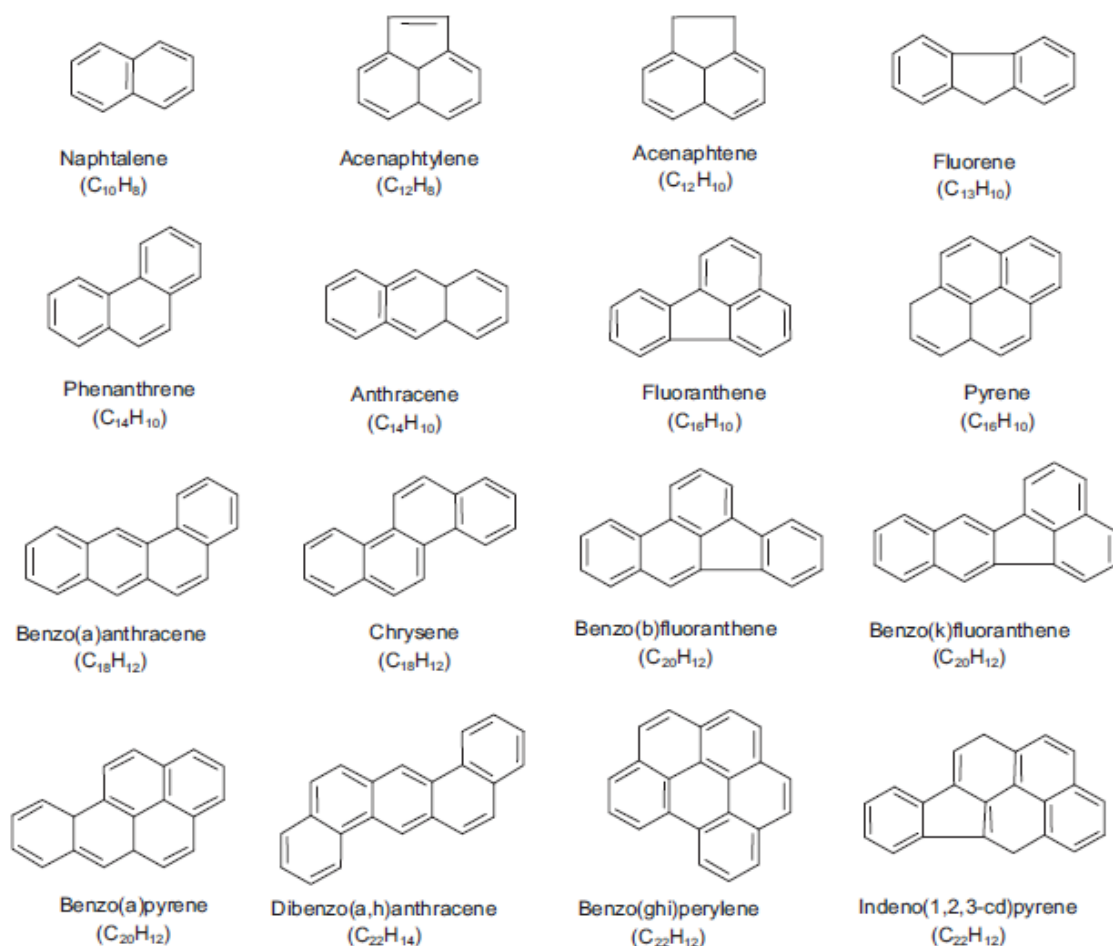
PAU představují skupinu nebezpečných všudypřítomných environmentálních polutantů (znečišťující chemické látky) vznikajících v procesu nedokonalého spalování organické matrice, které do prostředí vstupují ve formě aerosolů a plynů. [38], [39] Byly detekovány prakticky ve všech částech prostředí, biotických i abiotických, v průmyslových oblastech i v oblastech vzdálených od průmyslových a městských center. Jsou tvořeny dvěma nebo více kondenzovanými benzenovými jádry v lineárním, angulárním (úhlovém) nebo klastrovém (minimálně jedno jádro je obklopeno alespoň třemi jinými kondenzovanými jádry, např. pyren) uspořádání. PAU se dvěma až čtyřmi aromatickými kruhy se v atmosféře převážně nacházejí v plynné fázi, zatímco PAU s pěti a více kruhy na povrchu pevných částic. [39]

Vlastnosti

Za normálních podmínek jsou PAU tuhé, většinou bezbarvé, bílé nebo žlutozelené látky s poměrně vysokými body varu i tání, což je dáno počtem benzenových jader a strukturou molekuly. [39] PAU tvořené méně než čtyřmi aromatickými kruhy jsou pohyblivé v prostředí, zatímco PAU s vyšší molekulovou hmotností, které tvoří více než čtyři kondenzovaná jádra, jsou relativně nepohyblivé a nerozpustné. [40]

PAU jsou sloučeniny s velice rozmanitými rizikovými vlastnostmi, řada z nich jsou potenciální karcinogeny a mutageny, mnohé mají toxické vlastnosti. Výskyt těchto látek v prostředí představuje závažné nebezpečí. [40] Metabolismus, mutagenita a případná karcinogenita závisí z velké části na jejich struktuře. Ze studií vyplývá, že nežádoucí účinky stoupají se vzrůstajícím počtem kondenzovaných aromatických jader, maxima je dosaženo u uhlovodíků s pěti kondenzovanými benzenovými jádry, pak nebezpečnost opět klesá. [39]

Agentura pro ochranu životního prostředí (US EPA) v dnešní době nejčastěji sleduje 16 prioritních PAU (viz Obrázek 7), z nichž uvádí osm závažných karcinogenů, kterými jsou: benzo(a)pyren, benzo(a)antracen, chrysen, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, dibenzo(a,h)antracen, benzo(g,h,i)perylene a ideno(1,2,3-cd)pyren. [40]



Obrázek 7 - Strukturní vzorce látek, obsažených v RM (16 US EPA PAH) [3]

Vznik a zdroje PAU

PAU vznikají ve spalovacích zařízeních při spalování nasycených uhlovodíků, za vysoké teploty a nepřístupu vzduchu v nevhodných spalovacích podmínkách. [42] Při pyrolýze (teplota nad 700°C), jsou organické molekuly štěpeny na menší nestabilní molekuly a v přítomnosti atomů O, N, S aj. dochází k tvorbě příslušných heterocyklických analogů. Tyto volné radikály uhlovodíků se rekombinují v redukční zóně plamene, při teplotách 500-800°C, za vzniku aromatických uhlovodíků. [41]

Přítomnost PAU v prostředí lze podle původu rozdělit na přírodní a antropogenní. [40] Dominantní příčinou výskytu PAU je antropogenní činnost spojená s průmyslovou výrobou (elektrárny, koksovny, zpracování ropy, výroba barviv apod.), ale neméně podstatné jsou i zdroje neprůmyslové činnosti jako je pálení odpadů, domácí topeniště, požáry či kouření obyvatelstva. Přírodní zdroje znečištění pochází z biochemických syntéz makrofyty a organismy, nebo vulkanickou činností či z hornin a minerálů.

Příčinou výskytu PAU v potravinách může být mj. kontaminace technologickými zásahy, prováděné během výroby poživatin nebo významnějším exogenním znečištěním, kdy potraviny přicházejí do styku se zplodinami hoření při grilování, přímém sušení, uzení a pražení. [43]

Stanovení PAU

Při určení metody stanovení PAU záleží na druhu vzorku (půda, vzduch, organická matrice aj.). PAU vykazují silnou absorpci v UV oblasti a mají význačná fluorescenční spektra, což se využívá v kvalitativním a kvantitativní stanovení. [39]

Z ovzduší se PAU odebírají pomocí vzorkovacího čerpadla, které prosává vzduch přes vhodné filtry, na kterých se zachycují prachové částice, na nichž jsou PAU (zejména těžší) navázány. Tento aktivní způsob vzorkování umožňuje zároveň zakoncentrování PAU v odebíraném materiálu, jelikož přes jeden sorpční filtr je možné prosát řádově desítky m³ ovzduší. Současně se ale zakoncentrují i ostatní organické a anorganické látky, které jsou přítomny oproti PAU ve vyšších koncentracích, takže následně se PAU musí izolovat ze sorpčního filtru. [38], [39]

Existuje mnoho studií zabývajících se stanovením polycyklických aromatických uhlovodíků z organické matrice neboli vegetace. Tzv. biomonitoring využívá biologické organismy/materiály k hodnocení životního prostředí, které jsou vystaveny různým polutantům. [44] Rostliny působí jako účinné zachycovače, které v sobě akumulují chemické sloučeniny, a jsou tedy široce používány jako pasivní biomonitory. Nejčastěji se využívají stromy, lišejníky, a kumulativní biomonitory jako jsou houby, mechorosty nebo řasy. [46] Výhodou tohoto procesu je stálá přítomnost organismu/materiálu ve studované oblasti, a to i ve vzdálených oblastech, další výhodou je snadné vzorkování a nepotřebné drahé technické vybavení.

Holoubek a kolektiv analyzovali, na začátku 90. let minulého století, PAU v mechu (rodu *Hypnum cupressiforme*) a borovicovém jehličí (*Pinus sylvestris*) sesbírané na území České republiky. Usušené vzorky byly rozemlety a extrahovány Soxhletovým přístrojem za použití dichlormethanu jako rozpouštědla, doba extrakce trvala přibližně osm hodin. Vzorky pak byly adsorbovány na florisil při sloupcové chromatografii) a eluovány dichlormethanem. Objem vzorků byl redukován odpařením na rotační odparce na 5 ml a poté proudem dusíku na konečný objem 0,5 ml připravený pro chromatografickou analýzu, která byla provedena plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem. [45]

L. Foan a kolektiv použili herbářové mechy z různých let ke zkoumání historických změn atmosférické depozice PAU v severním Španělsku. Extrakce byla provedena Soxtec systémem (automatizovaný Soxhlet), kde nádoby z celulózy byly naplněny 1 g vzorku, bezvodým síranem sodným a florisilem. Extrakt byl nejprve zakoncentrován na rotační odparce, poté proudem dusíku. Bylo provedeno pročištění patronami Florisil SPE a po výměně rozpouštědla byly vzorky zfiltrvány a přidán vnitřní standard. Analýza byla prováděna pomocí HPLC s fluorescenčním detektorem. [44]

Oběcný způsob stanovení PAU (z ovzduší nebo z rostlinné matrice) spočívá v odebrání vzorku ze studované oblasti, přípravy reprezentativního vzorku, který je po extrakci a po dalších úpravách analyzován vhodnou analytickou metodou. Instrumentální analýza PAU je standardně prováděna vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s fluorescenčním detektorem (FLD) nebo hmotnostním spektrometrem (MSD), které díky této detekci umožňují dosáhnout vysoké selektivity a citlivosti. [39], [47] Pro stanovení PAU s nižší a střední molekulovou hmotností se využívá plynová chromatografie (GC) s hmotnostním detektorem (MSD) po extrakci kapalina – kapalina, nebo po extrakci do tuhé fáze (SPE), výhoda této metody spočívá ve vysoké separační účinnosti a snadné kvantifikaci píku.

3 PRAKTICKÁ ČÁST

V praktické části bude popsán optimalizovaný postup metodiky stanovování kapsaicinoidů a polycyklických aromatických látek z biologického materiálu. V první řadě bude popsána příprava vzorků, dále bude popsána samotná analýza a stanovení látek reálných vzorků a v neposlední řadě vyhodnocení dosažených výsledků. Pro analýzu obsahu organických látek ze vzorku byla použita metoda vycházející z bakalářské práce „Stanovení kapsaicinu v biologickém materiálu“ od Jiřího Bartoše a z mé bakalářské práce „Mechy jako biomonitory atmosférického znečištění perzistentních organických látek v Ostravsko-Karvinské aglomeraci“.

3.1 Materiály

3.1.1 Použité biologické matrice

Pro účely stanovení kapsaicinu a dihydrokapsaicinu byly vybrány dva druhy chilli koření od výrobce Vitana, zakoupené v obchodních řetězcích. Pro otestování vlivu homogenizace vzorku na stanovení bylo použito koření ve dvou formách (mleté, kousky). Mleté chilli koření a kousky chilli koření (viz Obrázek 8) byly skladovány v uzavíratelném sáčku na temném a suchém místě.



Obrázek 8 – Vzorky chilli pro stanovení kapsaicinu a dihydrokapsaicinu [autor]

Pro optimalizaci postupu stanovení PAU posloužily křemenné filtry, které slouží k zachytu prašných částic, u nichž se předpokládá výskyt navázaných složek PAU. Ačkoliv se nejedná o materiál organického původu, nepředpokládají se na rozdíl od organické matrice velké interference. Byly použity filtry z různých odběrových míst v Moravskoslezském kraji a různých období. Za účelem vytvoření reprezentativního vzorku s porovnatelnými vlastnostmi byly exponované filtry (viz Obrázek 9) rozstříhány na pravidelné části a tyto části promíchány a seskupeny tak, aby součet částí v každém vzorku byl roven dvěma filtrům. Tj. pro sadu 4 vzorků bylo vybráno 8 filtrů, každý rozdělen na čtvrtiny, takže každý zpracovávaný vzorek obsahoval čtvrtinu z každého z osmi filtrů. Takto připravené vzorky byly před extrakcí ještě zváženy.



Obrázek 9 – Křemenné filtry použité pro stanovení PAU [autor]

Optimalizovaná metoda pro stanovení PAU by byla následně aplikována na reálné vzorky mechu. Ze vzorku mechu nasbíraného v terénu byly odstraněny nežádoucí kontaminanty jako hmyz, listí, jehličí a zaschlá hlína aj. Na Obrázku 10. je ukázán mech po očištění, připravený pro extrakci.



Obrázek 10 – Očištěný vzorek mechu [autor]

3.1.2 Použité chemikálie

- Methanol (CH_3OH) chromapur GG (BC Chemservis, ČR)
- Acetonitril (CH_3CN) chromapur GG (BC Chemservis, ČR)
- Dichlormethan (CH_2Cl_2) chromapur GG (BC Chemservis, ČR)
- Kyselina octová (0,5% CH_3COOH), p.a., Lach-Ner (ČR)
- Standard kapsaicinu (98%, HPLC) a dihydrokapsaicinu (98%, HPLC), (Sigma-Aldrich, Německo)
- 1-fluornaftalen, 99% a 2-fluorobifenyl 98%. (Supelco, USA)
- Standard EPA PAH16 (Absolute Standards, USA)

Dále byla použita destilovaná voda a chrom-sírová směs k čištění skleněných pomůcek.

3.1.3 Použité pomůcky a zařízení

Při práci v laboratoři bylo použito běžné laboratorní sklo, které bylo před každým použitím naloženo v chrom-sírové směsi, aby byly odstraněny organické nečistoty. Poté bylo omyto destilovanou vodou a po vysušení v sušárně při 250 °C bylo uschováno v čistém prostředí. Dále v této práci byly použity následující pomůcky a přístroje:

- Automatické pipety 10 – 100 μl
- Analytické váhy (Adventurer Pro AV264CM, Ohaus, USA)
- Centrifuga (Hettich Rotofix 32 A, Německo)
- Koncentrátor (Stuart sample concentrator, SBHCONC/1, USA)
- Behrotest – 4 pozicový Soxhletův extraktor 30 ml s kohoutem pro odpouštění rozpouštědla (Behr, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (Bandelin Sonorex Super RK 510 H, Německo)
- Vysokoúčinný kapalinový chromatograf (HPLC) Shimadzu Nexera s fluorescenčním a UV/VIS detektorem (Shimadzu, Japonsko)
- Mikrovlnný rozkladný systém (Milestone Ethos up, Itálie)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava vzorků pro HPLC analýzu - kapsaicinoidy

Nejdůležitějším krokem celé analýzy je příprava vzorků pro samotnou analýzu. V rámci práce bylo důležité najít nejúčinnější extrakční metodu, která je časově nenáročná, množství vzorku a rozpouštědla je malé, a při které je možné extrahovat více vzorků najednou. Proto byla příprava vzorků pro analýzu uskutečněna třemi různými extrakčními postupy, a to extrakcí Soxhletovým extraktorem, ultrazvukovou extrakcí a mikrovlnnou extrakcí, s použitím tří různých rozpouštědel (methanol, acetonitril, dichlormethan) při různých extrakčních časech. Každá z variant extrakce byla prováděna ve dvou paralelních opakováních.

Postup přípravy vzorků v Soxhletově extraktoru

V digestoři byla sestavena aparatura pro extrakci dle Soxhleta (Obrázek 11), která se skládá z varné baňky, extrakčního nástavce a zpětného chladiče. Do extrakčního nástavce byla vložena patrona z filtračního papíru s navázkou 2 g vzorku chilli koření. Do varné baňky byl vložen varný kamínek a cca 70 ml extrakčního rozpouštědla. Po sestavení kompletní aparatury byl spuštěn přívod chladicí vody a zapnuto vyhřívání topných hnízd, extrakce probíhala 4 hodiny. Po čtyřech hodinách byl ukončen ohřev vzorků a kohoutem na těle extraktoru odpuštěno zkondenzované rozpouštědlo. Po vychladnutí byla aparatura rozebrána, vzorky převedeny do 50 ml odměrných baněk varné baňky vypláchnuty čistým rozpouštědlem. Oplachové porce rozpouštědla byly přidány ke vzorkům v odměrných bankách a objem doplněn po rysku čistým rozpouštědlem.



Obrázek 11 - Soxhletův extraktor v laboratoři [autor]

Postup přípravy vzorků ultrazvukovou extrakcí

Pro tuto extrakční techniku byly použity skleněné zkumavky se závitem, do kterých bylo naváženo s přesností na 1 mg cca 0,5 g vzorku chilli koření. Do zkumavky bylo přidáno 10 ml rozpouštědla. Stojánek s uzavřenými zkumavkami byl umístěn do ultrazvukové lázně (Obrázek 12). Extrakce probíhala po dobu 30-ti a 60-ti minut při laboratorní teplotě bez přídavného vyhřívání lázně. Po skončení extrakce byly vzorky centrifugovány po dobu 5 minut při 4000 otáčkách za minutu a jednotlivé extrakty byly přefiltrovány přes stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,45 μ m.



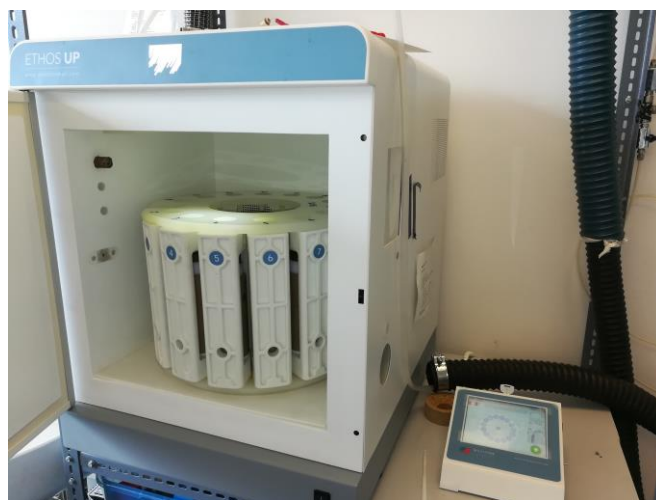
Obrázek 12 - Ultrazvuková lázeň v laboratoři [autor]

Postup přípravy vzorků mikrovlnnou extrakcí

Pro extrakci byl použit mikrovlnný systém Ethos Up – Milestone, který je vybaven 15-ti reakčními patronami (Obrázek 13). Před extrakcí chilli koření, byly patrony vyčištěny dvoukrokovým postupem. V prvním kroku cca 15 ml destilované vody v každé patroně bylo ohříváno na 120 °C po dobu 10 min. V druhém kroku byl stejný proces opakován s příslušným rozpouštědlem při teplotě 10-20 °C nad jeho bodem varu za atmosférického tlaku.

Do patron bylo naváženo 0,5 g vzorku chilli koření, bylo přidáno 15 ml rozpouštědla a po uzavření byly vloženy do mikrovlnného systému a spuštěn ohřev po dobu 5, 10 a 20 min. Na základě rozdílných teplot varu rozpouštědel, byla vždy před každou extrakcí nastavena jiná teplota směsi. Pro extrakční rozpouštědlo methanol (bod varu 64,7 °C) byla nastavena teplota ohřevu na 85 °C, pro acetonitril (bod varu 81 °C) na 90 °C a pro dichlormethan (bod varu 39,6 °C) na 50 °C. Výkon zařízení byl po celou dobu nastaven na 500W (jedná se o maximální aplikovatelný výkon, aktuálně používaná intenzita vyzařovaného výkonu je řízena měřenou teplotou reakční směsi a je nižší).

Po extrakci je nutno nechat extrakční patrony se vzorky vychladnout na pokojovou teplotu, aby nedošlo k úniku vzorku parami pod tlakem. Po vychladnutí byly vzorky z reakčních patron převedeny do zkumavek a centrifugovány po dobu 5 minut při 4000 otáčkách za minutu. Vzorky z mikrovlnné a ultrazvukové extrakce byly před HPLC analýzou 100x naředěny.



Obrázek 13 - Mikrovlnný systém Ethos Up v laboratoři [autor]

3.2.2 Příprava vzorků pro HPLC analýzu - PAU

Postup přípravy vzorků pro stanovení PAU je obdobný jako u přípravy vzorků pro stanovení kapsaicinu, odlišuje se pouze v navážce vzorku a zejména následnými kroky výměny rozpouštědla z dichlormethanu, v němž probíhá extrakce na acetonitril, ve kterém je vzorek analyzován a zakoncentrování extraktu do malého objemu rozpouštědla.

Po ukončení extrakce (Soxhlet, mikrovlnné) byl extrakt v dichlormethanu převeden do skleněných zkumavek, ve kterých proběhlo zakoncentrování pod proudem dusíku. Zkumavky s extrakty byly vloženy do koncentrátoru (Obrázek 14) a pod proudem dusíku vyhřívány na 30 °C. Dichlormethan byl takto odpařen na objem 0,5 – 1 ml, poté byly do zkumavky přidány 4 ml acetonitrilu a opět se nechal extrakt zakoncentrovat do stejného objemu. Takto připravený vzorek byl převeden do 2 ml skleněné vialky.



Obrázek 14 - Koncentrátor Stuart v laboratoři [autor]

3.2.3 HPLC analýza

Stanovení organických látek probíhalo, na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu Nexera (Shimadzu, Japonsko), vybaveném automatickým injektorem vzorku, čerpadlem mobilní fáze, termostatem na kolonu a UV/VIS a fluorescenčním detektorem

Kapsaicinoidy

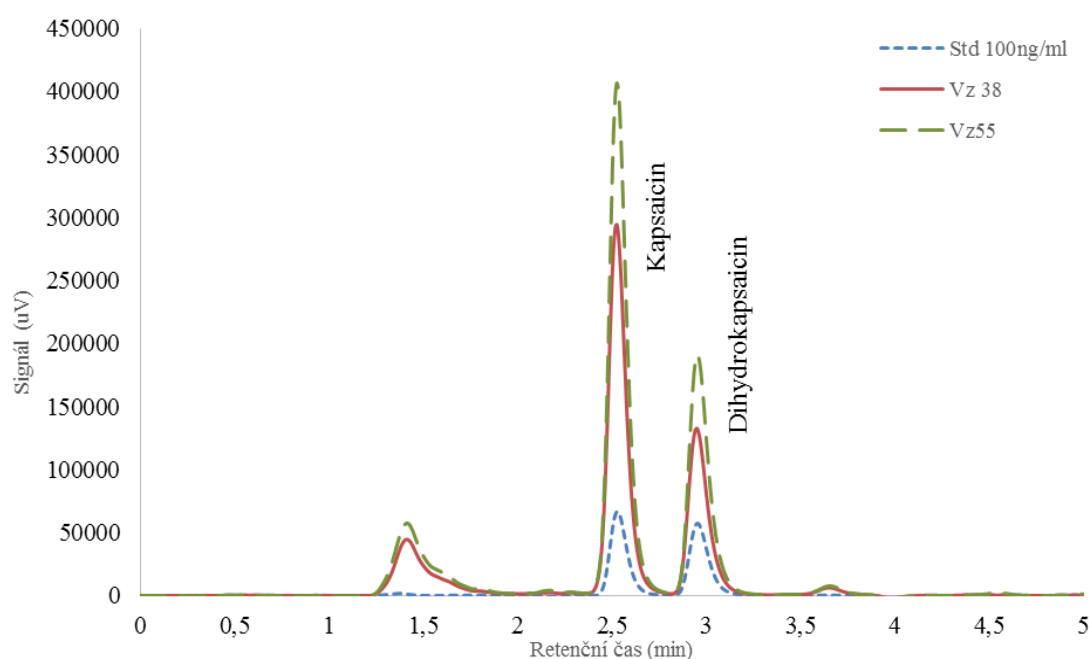
Metoda použitá pro chromatografickou separaci kapsaicinoidů a nastavení přístroje jsou uvedeny v tabulce 1. Identifikace jednotlivých látek je prováděna podle retenčních časů

2,52 minuty pro kapsaicin a 2,95 minuty pro dihydrokapsaicin. Limit stanovitelnosti metody byl vypočten jako desetinásobek směrodatné odchylky šumu na 0,05ng/ml pro kapsaicin i dihydrokapsaicin. Suma 0,1 ng/ml kapsaicinoidů odpovídá podle postupu přípravy extraktu 0,025 mg/g pro Soxhletovu extrakci, 0,02 mg/g pro ultrazvukovou extrakci a 0,03 mg/g pro mikrovlnnou extrakci.

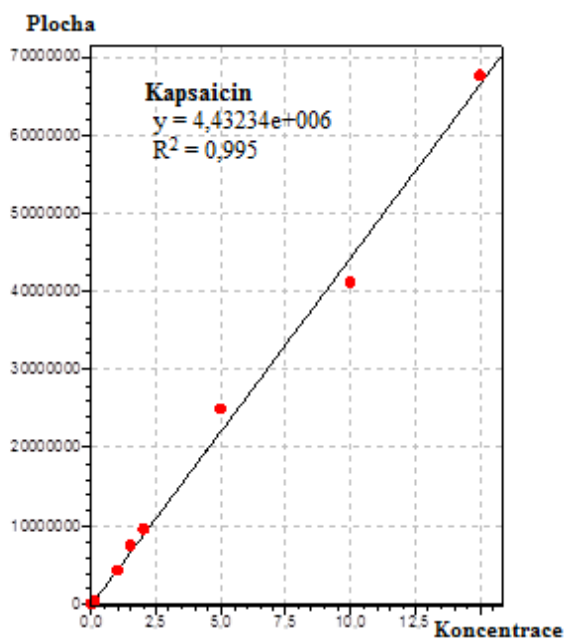
Tabulka 1: Nastavení HPLC pro stanovení kapsaicinoidů

Kolona	Kinetex 150 x 4,6 mm, 2,6 μ m (Phenomenex, USA)
Složení mobilní fáze:	Acetonitril (MF A) - 1,8 mM H ₃ PO ₄ (MF B)
Průtok mobilní fáze:	1 ml/min, izokraticky, poměr MF A:B 70:30
Objem nástřiku:	20 μ l
Teplota kolony:	25 °C
Detekce:	Fluorescenční, excitace 280 nm, emise 310 nm
Doba analýzy:	5 min

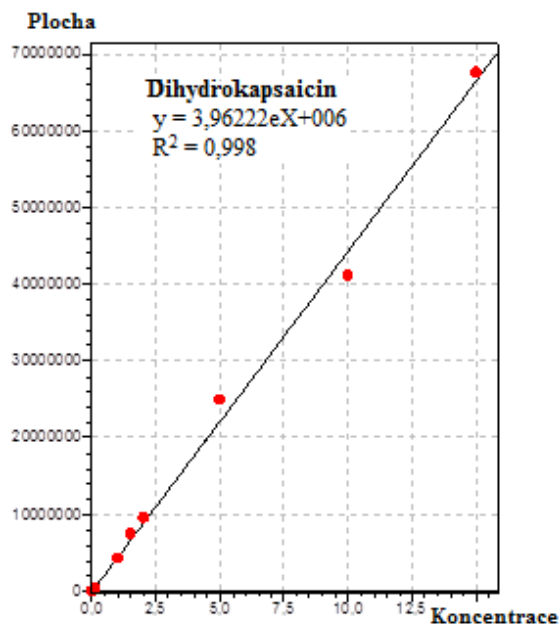
Stanovení množství kapsaicinu a dihydrokapsaicinu ve vzorcích bylo provedeno metodou kalibrační křivky. Pro kalibrace byla zvolena metoda přímého stanovení. Sedm kalibračních roztoků bylo připraveno ředěním analytických standardů acetonitrem. Připravené roztoky, v koncentračním rozsahu 0,01 – 15 mg.l⁻¹, byly přímo injektovány do HPLC a analyzovány výše uvedenou metodou. Na Obrázku 15 je zobrazen chromatogram kapsaicinoidů, s identifikovanými píky kapsaicinu a dihydrokapsaicinu. Obrázky 16 a 17 ukazují kalibrační závislosti obou látek



Obrázek 15 – Chromatogram kapsaicinoidů [autor]



Obrázek 16 – Kalibrační závislost kapsaicinu [autor]



Obrázek 17 - Kalibrační závislost dihydrokapsaicinu [autor]

Polycyklické aromatické uhlovodíky

Pro chromatografickou separaci PAU byla použita gradientová eluce, parametry metody jsou uvedeny v tabulce 2 a retenční časy a limity stanovitelnosti jednotlivých látek jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 2: Nastavení HPLC pro stanovení PAU

Kolona:	Zorbax Eclipse PAH (Agilent, USA)			
Objem nástriku:	20 μ l			
Složení mobilní fáze:	Acetonitril – voda			
Průtok mobilní fáze:	1 ml/min			
Gradient	Min 0	Voda	50	AcN 50
	5		50	50
	21.5		0	100
	26		0	100
	28.5		50	50
	39		50	50
Teplota kolony:	25 °C			
Detekce:	Fluorescenční, vlnové délky uvedeny v Tab.4			
Doba analýzy:	40 min			

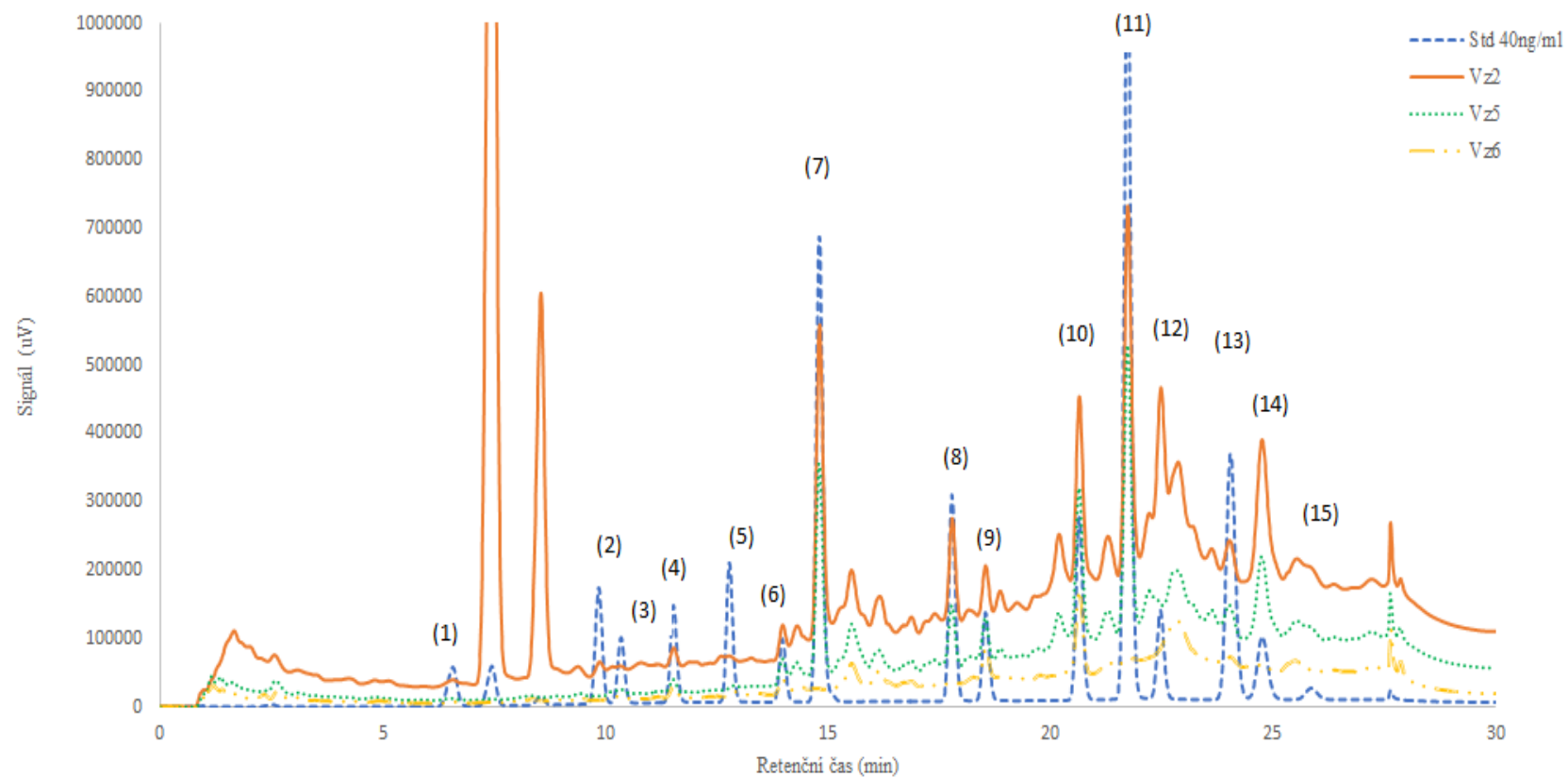
Tabulka 3: Retenční časy, vlnové délky a limity stanovitelnosti látek PAU

Látka	Retenční čas (min)	Vlnová délka excitace (nm)	Vlnová délka emise (nm)	Limit stanovitelnosti (ng/ml)*
(1)Naftalen	6,6	275	350	31,2
1-fluornaftalen**	7,4	275	350	---
2-fluorbifeny]**	8,5	275	350	---
(2)Acenaften	9,9	275	350	14,2
(3)Fluoren	10,3	275	350	14,1
(4) Fenanthren	11,5	275	350	11,0
(5) Anthracen	12,8	260	420	1,8
(6) Fluoranthren	14,0	270	440	15,1
(7) Pyren	14,8	270	388	2,9
(8) Benzo[a]anthracen	17,8	260	420	5,2
(9) Chrysen	18,5	260	420	16,1
(10) Benzo[b]fluoranthren	20,6	290	430	5,6
(11) Benzo[k]fluoranthren	21,7	290	430	1,5
(12) Benzo[a]pyren	22,5	290	430	2,0
(13) Dibenz[a,h,]anthracen	24,0	300	415	2,9
(14) Benzo[g,h,i,]perylene	24,8	300	415	4,3
(15) Indeno[1,2,3-cd]pyren	25,8	300	466	58,0

*Převzato z validačního protokolu akreditované metody Laboratoře IET

** Neurčen limit stanovitelnosti, přidávají se jako standardy pro určení výtěžnosti v konstantním množství

Samotné stanovení koncentrace PAU ve vzorcích bylo provedeno metodou kalibrační křivky, kdy byla proměřena řada zředěných vzorků referenčního materiálu (RM PAH), použit byl standard EPA PAH16 (Absolute Standards, USA). Kalibrační křivky byly připraveny víceúrovňovou kalibrací na standardní kalibrační roztoky připravené ze základního roztoku RM PAH v metanolu. Na následujícím Obrázku 18 je znázorněn chromatogram připraveného standardu o koncentraci 40 ng/g a extrahovaných vzorků pro stanovení PAU.



(1) Naftalen, (2) Acenaften, (3) Fluoren, (4) Fenanthren, (5) Anthracen, (6) Fluoranthren, (7) Pyren, (8) Benzo[a]anthracen, (9) Chrysen, (10) Benzo[b]fluoranthren, (11) Benzo[k]fluoranthren, (12) Benzo[a]pyren, (13) Dibenz[a,h]anthracen, (14) Benzo[g,h,i]perylen, (15) Indeno[1,2,3-cd]pyren

Obrázek 18 - Chromatogram polycyklických aromatických uhlovodíků [autor]

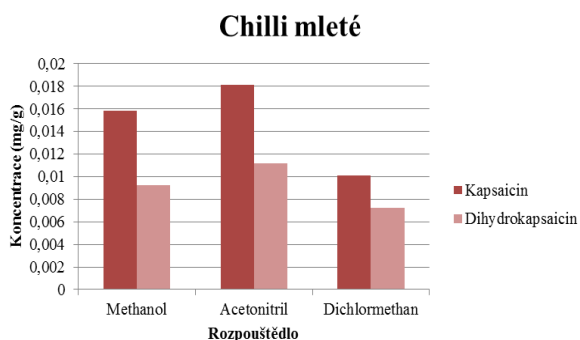
4 VÝSLEDKY MĚŘENÍ A DISKUSE

4.1 Kapsaicinoidy

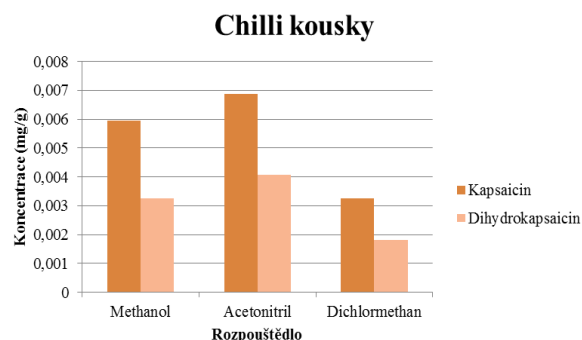
4.1.1 Výběr extrakčního činidla

Na základě literární rešerše bylo zvoleno a následně testováno několik extrakčních činidel. Při výběru vhodného extrakčního činidla byl kladen důraz zejména na to, aby činidlo mělo dostatečně vysokou extrakční účinnost, aby dostatečně absorbovalo energii mikrovln.

Rozpouštědla, která byla studována pro extrakci kapsaicinoidů z biologické matrice vzorku, jsou methanol, acetonitril a dichlormethan. U methanolu a acetonitrilu se jedná o polární rozpouštědla, která dokážou absorbovat velké množství mikrovlnné energie, což může usnadnit proces extrakce kapsaicinoidů. Dichlormethan byl použit pro ověření, jestli ho bude možno zahřívat v mikrovlnném reaktoru po dobu extrakce.



Obrázek 19 – Výsledky MAE extrakce různými rozpouštědly (Chilli mleté)



Obrázek 20 – Výsledky MAE extrakce různými rozpouštědly (Chilli kousky)

Extrakce byly provedeny dle postupu v kap. 3.2.1, výsledky jsou uvedeny v Tab 4 a 5 (str. 45-46), obrázky 19 a 20 vyobrazují koncentraci v mg/g kapsaicinu a dihydrokapsaicinu, které byly vyextrahované třemi testovanými rozpouštědly u vzorků chilli kousky a chilli mleté. U vzorků koření chilli kousky byl obsah kapsaicinoidů nižší, v průměru 69 % obsahu v mletém vzorku chilli při použití stejných postupů (v rozmezí 58-72 % u jednotlivých stanovení). Při zohlednění nejistoty stanovení není statisticky významný rozdíl mezi koncentrací kapsaicinoidů extrahovaných acetonitrem a methanolem. Práce s extrakty v dichlormethanu byla ztížena nutností zařadit do postupu zpracování filtraci přes stříkačkový filtr. Kvůli vyšší viskozitě nebylo možno zcela oddělit pevné částice centrifugací, čímž se

prodloužila doba přípravy vzorku k analýze. Oproti acetonitrilu a methanolu měla extrakce dichlormethan nejnižší výtěžnost, ale experimenty ukázaly, že v reakčním objemu 15 ml lze dichlormethan mikrovlnami zahřívát po celou dobu experimentu.

4.1.2 Extrakční doba

Obecně se se zvýšením doby extrakce zvyšuje množství extrahovaných analytů. Pro určení času potřebného k účinné extrakci, byly provedeny extrakce v době trvání 5, 10 a 20 min. Mikrovlnná extrakce vychází jako nejúčinnější metoda, patrně kvůli vyšším permeabilitám rozpouštědel za zvýšené teploty a tlaku, nicméně u hrubě sekaného vzorku je patrný vliv délky reakce na výtěžnost. Pro srovnání účinnosti extrakce byl v každé sadě vzorků vybrán postup, při němž se našlo nejvyšší množství kapsaicinoidů ve vzorku a toto bylo zvoleno jako 100% množství extrahovatelných látek. K němu pak byly ostatní hodnoty vztaženy jako výtěžnost postupu.

Tabulka 4: Srovnání extrakčních technik, mleté koření

Typ extrakce, podmínky	Doba extrakce [min]	Rozpouštědlo	Koncentrace – suma kapsaicin a dihydrokapsaicin [mg/g]	Výtěžnost [%]
Soxhlet	240	Methanol	$0,0104 \pm 0,0006$	37
2g vzorku		Acetonitril	$0,0135 \pm 0,0007$	48
70ml rozp.		Dichlormethan	$0,0073 \pm 0,0008$	26
Ultrazvuk	30	Methanol	$0,0071 \pm 0,0001$	26
	60		$0,0079 \pm 0,0002$	28
0,5g vzorku	30	Acetonitril	$0,0123 \pm 0,0020$	44
10 ml rozp.	60		$0,0134 \pm 0,0002$	48
	30	Dichlormethan	$0,0119 \pm 0,0004$	43
	60		$0,0103 \pm 0,0010$	37
Mikrovlnná	5 – 20*	Methanol	$0,0259 \pm 0,0021$	93
0,5g vzorku		Acetonitril	$0,0279 \pm 0,0026$	100
15 ml rozp.		Dichlormethan	$0,0150 \pm 0,0039$	54

* rozdíl koncentrací mezi různými dobami extrakce není statisticky významný. Hodnoty jsou spočteny jako průměr a směrodatná odchylka ze 6 opakování.

Výsledky extrakcí mletého koření oproti kouskům mají obecně nižší rozdíly mezi paralelními extrakcemi, na vliv jemnosti vzorku a jeho kontaktní plochy ukazují také porovnání různé délky extrakce, kdy v případě mletého vzorku doba extrakce nehrála roli a extrahované množství kapsaicinoidů se mezi extrakcemi stejným rozpouštědlem téměř nelišilo. Roli zřejmě hraje také horší homogenita hrubého vzorku, Soxhletovy extrakce

s navázkou 2 g vykazují oproti experimentům s navázkou 0,5 g menší rozdíly v paralelních stanoveních.

Ze srovnání výsledků ultrazvukových extrakcí je patrné, že při prodloužení doby extrakce se výtěžek kapsaicinoidů výrazně nenavýšil. Proto je možné zvolit kratší dobu extrakce, která je dostatečná pro extrakci stanovovaných analytů.

Tabulka 5: Srovnání extrakčních technik, chilli kousky

Typ extrakce, podmínky	Doba extrakce [min]	Rozpouštědlo	Koncentrace – suma kapsaicin a dihydrokapsaicin [mg/g]	Výtěžnost [%]
Soxhlet 2g vzorku 70ml rozp.	240	Methanol	$0,0070 \pm 0,0003$	49
		Acetonitril	$0,0092 \pm 0,0019$	64
		Dichlormethan	$0,0035 \pm 0,0005$	24
Ultrazvuk 0,5g vzorku 10 ml rozp.	30	Methanol	$0,0041 \pm 0,0004$	28
	60		$0,0101 \pm 0,0028$	70
	30	Acetonitril	$0,0063 \pm 0,0008$	44
	60		$0,0078 \pm 0,0012$	54
	30	Dichlormethan	$0,0069 \pm 0,0002$	48
	60		$0,0086 \pm 0,0012$	60
Mikrovlnná 0,5g vzorku 15 ml rozp.	5	Methanol	$0,0093 \pm 0,0012$	64
	10		$0,0104 \pm 0,0017$	72
	20		$0,0144 \pm 0,0083$	100
	5	Acetonitril	$0,0042^*$	29
	10		$0,0109^*$	76
	20		$0,0136^*$	94
	5	Dichlormethan	$0,0034^*$	26
	10		$0,0037^*$	24
	20		$0,0051^*$	35

*U extrakcí kousků acetonitrilem a dichlormethanem byly ve všech paralelních dvojicích stanoveny u jednoho vzorku změřené hodnoty, zatímco u druhého se nacházely pod limitem stanovitelnosti.

4.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky

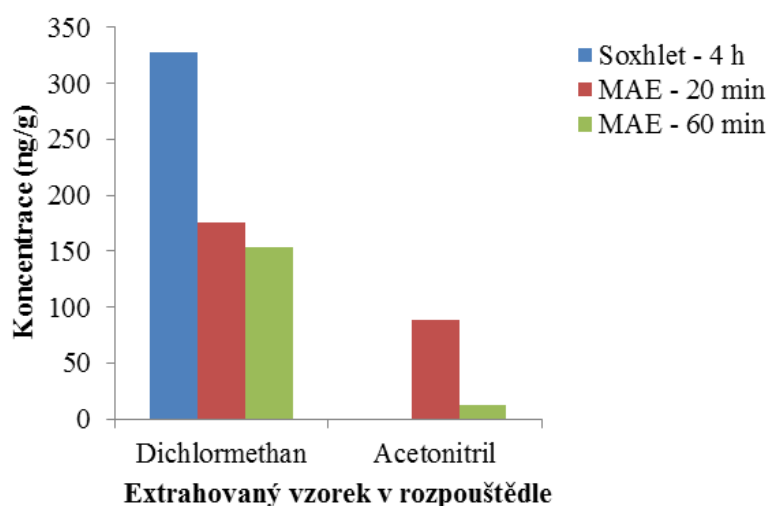
Příprava vzorků a stanovení PAU bylo prováděno výše popsányými postupy. Byly testovány dvě extrakční techniky, a to referenční Soxhletova extrakce, akreditovaná metoda pro stanovení PAU, a mikrovlnná extrakce. Pro extrakci byla použita dvě extrakční rozpouštědla - dichlormethan, který je používán pro Soxhletovy extrakce při stanovení PAU a acetonitril, který se u kapsaicinoidů jevil jako nejúčinnější rozpouštědlo, vzhledem k možné vysoké dosažitelné teplotě a používá se v analýze PAU jako rozpouštědlo v mobilní fázi. Možnost jeho použití by představovala odstranění kroku výměny rozpouštědla při přípravě vzorku, protože obě rozpouštědla jsou nemísitelná.

Pro stanovení byly použity křemenné filtry, které byly rozděleny do pěti sad (A-E) reprezentativních vzorků. Extrakční doba u klasické Soxhletovy extrakce je dle akreditované metody 4 hodiny, u mikrovlnné extrakce byla testována extrakční doba 20 a 60 min.

Výsledky stanovení PAU jsou uvedeny v tabulkách v příloze 1 a 2.

4.2.1 Extrakční činidlo

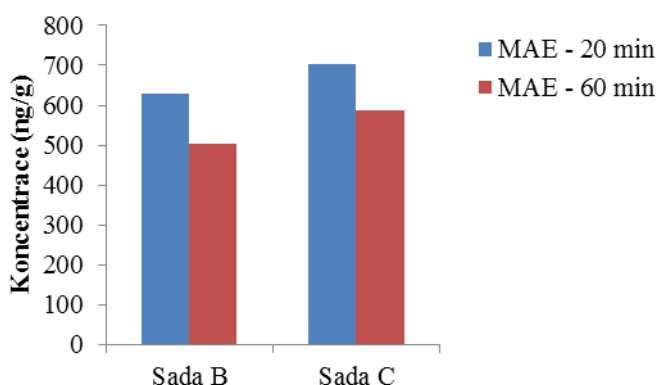
Z uvedeného porovnání extrakční výtěžnosti PAU (Obrázek 21) je patrný rozdíl mezi extrační účinností rozpouštědel. Extrakce acetonitrem představovala v průměru 7% výtěžnosti oproti extrakci dichlormethanem. Acetonitril, je jako extrakční činidlo pro PAU zcela nevhodné.



Obrázek 21 – Srovnání účinnosti extrakčních technik v různých rozpouštědlech [autor]

4.2.2 Extrakční doba

Z experimentů vyplývá, že prodloužená extrakční doba v mikrovlnném systému má za následek nižší stanovený obsah PAU. V porovnání na Obrázku 22 jsou dvě sady filtrů (B, C) extrahovaných po dobu 20 a 60 min, kde delší extrakce dosáhla nižší výtěžnosti. Tyto skutečnosti poukazují nejspíše na ztrátu analytů při zpracování vzorků. Jelikož je postup mimo extrakční krok identický, je možné, že způsobené ztráty jsou způsobeny interakcí s materiálem patron. Patrony jsou vyrobeny z PTFE, který je porézní a na kterém se zřejmě zachytávají jednotlivé látky PAU. Na Obrázku 18 jsou porovnávány chromatogramy analýzy vzorků ze stejné sady filtrů se standardem PAU, kde je také patrné ubývání píků (jak PAU, tak doprovodných látek z extraktu – vz2 je vzorek extrahovaný Soxhletovou extrakcí, vz5 extrahovaný v mikrovlnném reaktoru po dobu 20 minut a vz6 po dobu jedné hodiny



Obrázek 22 – Porovnání extrakční doby MAE [autor]

V experimentech pro zjištění opakovatelnosti (sada B) byl potvrzen problém s přenosem analytů patronami, kdy ke vzorku nebyl přidáván vnitřní standard, a přesto ve výsledku byly fluorované látky (1-fluornaftalen, 2-fluorbifenyl) v měřených vzorcích nalezeny (viz Tabulka 7). Dále byla provedena zkušebně ještě Soxhletova extrakce na skleněné aparatuře, která byla pouze omyta dichlormethanem a nepodstoupila celou čistící proceduru (Soxhletova skleněná aparatura je čistěna v chromsírové směsi, poté je sklo omyto destilovanou vodou a sušeno při 250 °C). Patrony mikrovlnného systému jsou vyrobeny z pórovitého materiálu polytetrafluorethylenu (teflon) a čištění v chromsírové směsi se u patron neprovádí., čímž může docházet k vymývání ulpělých organických látek z předchozích extrakcí.

Tabulka 6- Výskyt fluorovaných derivátů PAU

Látky	MAE DCM 20min		MAE DCM 1hod		Soxhlet 4 hod
	Vz 8	Vz9	Vz10	Vz11	
1-fluornaftalen	3,929	nest.	4,701	nest.	39,319
2-fluorbifenyl	111,878	nest.	nest.	nest.	470,815

Na Obrázku 23 jsou zobrazeny napipetované objemy extraktů, se kterými se při stanovení stopového množství pracuje.

- **A**- objem 0,4 ml extraktu s pevným podílem po centrifugaci (Eppendorf zkumavka),
- **B** – objem 0,5 ml extraktu s pevným podílem po centrifugaci (Eppendorf zkumavka),
- **C** - objem 0,5 ml extraktu po filtraci (vialka),
- **D** – objem 0,2 ml extraktu po filtraci (vialka)
- **E** – objem 0,2 ml extraktu po filtraci (vialka s insertem).

Jelikož extrakty PAU musí podstoupit výměnu rozpouštědla a zakoncentrování na malý objem nemísitelném rozpouštědle, dochází většinou u vzorků k vylučování pevných částic nerozpustných látek, které je potřeba odstranit ze vzorku pro analýzu. Při zkušebním užití vialek s inserty pro zmenšení objemu vzorku (insert 200 μ l, oproti 2 ml vialky), které jsou zhotoveny z teflonu, bylo zjištěno, že oproti stejným vzorkům uchovávaným ve skle, obsahují nižší koncentrace PAU. Tímto experimentálním měřením byla potvrzena domněnka, že stopy PAU se na teflonu zachytávají.



Obrázek 23 – Malé objemy extraktů v různých nádobkách

4.3 Srovnání účinnosti klasické a nově použité metody

MAE v porovnání s extrakcí dle Soxhleta a ultrazvukovou extrakcí v případě stanovení kapsaicinoidů obsažených v chilli koření projevila vysokou extrakční účinnost během krátkého času (5 min). Z měření bylo prokázáno, že acetonitril je nejefektivnějším rozpouštědlem pro extrakci kapsaicinu z homogenizované dané matrice. MAE představuje

moderní techniku, při které je zredukován objem extrakčního činidla, z původně používaných 70 ml na 15 ml, snížen extrakční čas z původních 4 hod na 5 min, za zisku vyššího výtěžku stanovovaných analytů.

Naproti tomu při stanovování PAU z pevného vzorku byla klasická metoda dle Soxhleta zatím vyhodnocena stále jako neúčinnější metodou. Jak lze vidět na obrázku 21 (str. 47) po 20 minutách extrahování mikrovlnným zářením výtěžnost dosahovala v průměru 54%, po 60 minutách 47 % Soxhletovy extrakce. Na základě zjištění, že látky PAU ulpívají na materiálu patron, zůstává otázka jak v dalším postupu optimalizovat metodu pro stanovení PAU. Doporučením by bylo použití skleněných vložek do patron mikrovlnného reaktoru, tím by se přiblížilo k vlastnostem Soxhletovy aparatury.

Potenciálních problémů bylo nad očekávání a veškeré otestování by bylo časově nad rámec této práce. Proto i na základě zjištěných problémů a nekonzistentních výsledků stanovených PAU z křemenných filtrů nebyla metoda aplikována na vzorky mechu.

5 ZÁVĚR

V posledních letech se klade důraz na snížení spotřeby drahých, životnímu prostředí škodlivých, organických rozpouštědel a na urychlení procesu extrakce v laboratoři. Na základě těchto potřeb byly v rámci této diplomové práce studovány extrakční techniky k přípravě pevných vzorků, tradiční (Soxhletova extrakce, extrakce ultrazvukem) a vyvinutá extrakční technika MAE, pro stanovení stopového množství organických látek v biologické matrici. Stanovení proběhlo optimalizovanou metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.

V prvním kroku byly zjišťovány optimální podmínky MAE na vzorcích chilli koření, z nichž byly stanovovány kapsaicinoidy (kapsaicin, dihydrokapsaicin). Tato vyvinutá metoda posloužila jako základ pro optimalizaci metody pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků. Vyhodnocené výsledky byly poté srovnány s účinností klasických extrakčních technik,

Z výsledků provedených experimentů je patrné, že klasická technika Soxhletovy extrakce je oproti ultrazvukové a mikrovlnné extrakci časově náročná a vyžaduje velké množství organického rozpouštědla. Z testovaných rozpouštědel se ve všech případech ukázalo, že dichlormethan jako nepolární rozpouštědlo je méně vhodný pro extrakci kapsaicinoidů než polární rozpouštědla methanol a acetonitril. Bylo ovšem ověřeno, že i s rozpouštědly, která hůře absorbují mikrovlnné záření lze pracovat a jejich zahřívání v mikrovlnném poli je možné.

Velké rozdíly mezi paralelními stanoveními ve vzorku hrubých kousků chilli koření ukazují na problematickou homogenitu vzorku při menších navážkách, což by se dalo obejít zvýšením navážky a objemu rozpouštědla pro extrakci. Jemně mletý vzorek, jehož povrch je větší, se ukázal jako vhodnější pro zpracování.

Nejúčinnější extrakční technikou se prokázala extrakce mikrovlnným zářením v uzavřeném systému, jejíž značnou výhodou je možnost zahřívání rozpouštědla na teplotu vyšší, než je jeho bod varu za atmosférického tlaku, což má za následek zvýšení rychlosti a účinnosti extrakční techniky. Další nespornou výhodou je možnost extrahování několika vzorků současně (mezi 6–15) a kromě toho objem použitého rozpouštědla je 5 x nižší, než je požadováno pro Soxhletovu extrakci. Na základě získaných výsledků by bylo možné ještě optimalizovat dobu extrakce, podobně jako u ultrazvukové extrakce, kdy zvýšení reakční doby na dvojnásobek přineslo navýšení stanoveného obsahu kapsaicinoidů jen o méně než 10%. Srovnatelné výsledky mezi Soxhletovou extrakcí a extrakcí ultrazvukem ukazují, že

další zvýšení účinnosti extrakce závisí na zvýšení teploty nebo tlaku, případně obojího a za daných podmínek se zřejmě jedná o maximální extrahovatelné množství. Extrakce ultrazvukem by představovala zajímavou a levnou alternativu extrakční techniky, ovšem za předpokladu optimalizování pracovních podmínek, aby byla zajištěna dostatečná účinnost.

V druhém kroku byla tato optimalizovaná metoda aplikována na křemenné filtry, obsahující prachové částice ze vzduchu, pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků. Metoda extrakce v Soxhletově extraktoru dle akreditovaného postupu byla využita jako referenční metoda pro nově vyvíjející se techniku, jejímž cílem bylo potlačit některé nevýhody a zachovat stávající výhody.

Z vyhodnocených výsledků bylo zjištěno, že metoda MAE je schopná poskytovat příznivé výsledky pro stanovení kapsaicinoidů z chilli koření. Aplikováním metody na stanovení PAU, ale stále nedosahuje stejné, či vyšší účinnosti než je tomu u klasické Soxhletovy extrakce. Rozdílnost ve výsledcích je daná koncentrací látek v materiálu, přičemž extrahované vzorky PAU byly ještě následně při výměně rozpouštědla zakoncentrovávány, tím mohlo dojít k dalším ztrátám.

Experimentálně bylo prokázáno, že organické složky PAU se zachytávají na pórezním materiálu patron, využívaných pro extrakci v mikrovlnném reaktoru. Pro následnou optimalizaci metody doporučuji extrakci vzorku ve skleněných vložkách, které by byly vloženy do patron mikrovlnného systému. Pokud by se následnou optimalizací metody MAE dalo dosáhnout stejných výsledků účinnosti, jak tomu bylo u kapsaicinu, snížením extrakční doby ze standardních 4 hodin na 5 minut, 5x snížený objem použitého rozpouštědla a snížení obsahu vzorku, by představovala z pohledu zelené chemie metodu vhodnou pro rutinní stanovení PAU z biologické matrice.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LUQUE DE CASTRO, M. D. a F. PRIEGO-CAPOTE. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* [online]. 2010, **1217**(16), 2383-2389 [cit. 2019-03-20]. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967309016884>
- [2] ČÁSLAVSKÝ, Josef, Jiří ŠEVČÍK a spol. *Analýza organických látek, příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy*. Český Těšín: 2 theta, 2014.
- [3] COUFAL, P. *Separční metody*. [online]. Studijní opory. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>
- [4] CÍDLOVÁ, Hana a Irena PLUCKOVÁ. Laboratorní technika: Extrakce. *Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity, katedra chemie* [online]. 2008 [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/extrakce.html>
- [5] HELÁN, Václav, ed. *Analýza organických látek: sborník přednášek z kurzu*. 2., upravené a doplněné vydání. Český Těšín: 2 Theta, 2005. ISBN 80-863-8029-7.
- [6] HARWOOD, Laurence M. a Christopher J. MOODY. *Experimental organic chemistry: principles and practice*. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1990. ISBN 978-0632020171.
- [7] PLUHAŘOVÁ, Lenka. *Využití extrakce přehřátou vodou při analýze různých matric*. 2012. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Petra Bajerová, Ph.D.
- [8] KADERIDES, Kyriakos, Lygeri PAPAOIKONOMOU, Melania SERAFIM a Athanasia M. GOULA. Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification* [online]. 2019 [cit. 2019-03-20]. ISSN 02552701. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0255270118314363>
- [9] LIU, E.-H., QI, L.-W., CAO, J., LI, P., LI, C.-Y., PENG, Y.-B. Advances of Modern Chromatographic and Electrophoretic Methods in Separation and Analysis of Flavonoids. *Molecules* **2008**, *13*, 2521-2544.
- [10] DEAN, John R. *Extraction methods for environmental analysis*. New York: John Wiley, c1998. ISBN 04-719-8287-3.

- [11] SANCHEZ-PRADO, Lucia, Carmen GARCIA-JARES, Thierry DAGNAC a Maria LLOMPART. Microwave-assisted extraction of emerging pollutants in environmental and biological samples before chromatographic determination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2015, **71**, 119-143 [cit. 2019-04-20]. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993615001442>
- [12] WANG, Lijun a Curtis L. WELLER. *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. 2006, **17**(6), 300-312. ISSN 09242244. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224405003559>
- [13] PICÓ, Yolanda a Curtis L. WELLER. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013, **43**(6), 84-99. ISSN 01659936. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016599361200369X>
- [14] *Elektronické studijní materiály: Extrakční techniky* [online]. Brno [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/zobraz_cast.pl?cast=52968
- [15] JEŽOVÁ, Věra a Karel VENTURA. *SPME/HPLC: Katedra analytické chemie*. s. 67-75. ISBN 80-863-8029-7.
- [16] MARTIN, Adam, Petra BAJEROVÁ a Karel VENTURA. *Odběr a příprava vzorků k analýze - extrakční techniky, pasivní vzorkování organických polutantů: Mikroextrakční techniky*. s. 25-47. ISBN 80-863-8029-7.
- [17] DONATO, Paola, Francesco CACCIOLA, Marco BECCARIA, Paola DUGO a Luigi MONDELLO. Lipidomics. In: *Advanced Mass Spectrometry for Food Safety and Quality*. Elsevier, 2015. Comprehensive Analytical Chemistry. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978044463340800008X>
- [18] TESÁŘOVÁ, E. *Kapalinová chromatografie* [online]. Studijní opory. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy [cit. 2019-03-20]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~tesarove/hplc.pdf>
- [19] *Waters: Beginners Guide to Liquid Chromatography* [online]. USA, 2019 [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_US/HPLC---HighPerformance-LiquidChromatographyExplained/nav.htm?cid=10048919&locale=en_US
- [20] *Academy of Applied Pharmaceutical Sciences: A Brief History of High Performance Liquid Chromatography* [online]. Ontario, 2019 [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: <https://www.aapscollege.ca/blog/brief-history-high-performance-liquid-chromatography>

- [21] *University of Kentucky: History of HPLC* [online]. Lexington, Kentucky, 2019 [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: <http://asrg.contactincontext.org/asrg/hplc/history.html>
- [22] JANDERA, Pavel.: Pokroky v technice vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro analýzu organických látek. *Analýza organických látek, sborník přednášek z kurzu. 2. upr. vyd.* Český Těšín: 2THETA, 2005. s. 209-236. ISBN 80-86380-29-7.
- [23] *Chemguide: High performance liquid chromatography* [online]. United Kingdom: Jim Clark, 2009 [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: <https://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>
- [24] GÜNZLER, Helmut a Alex WILLIAMS. *Handbook of analytical techniques*. New York: Wiley-VCH, c2001. ISBN 35-273-0165-8.
- [25] JANDERA, Pavel. Kapalinová chromatografie (LC). *Analýza organických látek, příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy*. Český Těšín: 2THETA, 2014, s 101-132.
- [26] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [27] *HPLC: Základní charakteristiky chromatografického procesu* [online]. Česká republika, 2016 [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: http://www.hplc.cz/teorie/uvod.html#_Retenci_cas
- [28] PERUCKA, Irena a Wiesław OLESZEK. Extraction and determination of capsaicinoids in fruit of hot pepper *Capsicum annuum* L. by spectrophotometry and high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2000, 71(2), 287-291. ISSN 03088146. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814600001539>
- [29] KREMR, Daniel. *Extrakce kapsaicinoidů z chilli papriček podkritickou vodou* [online]. Pardubice, 2014 [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: http://konference.osu.cz/svk/sbornik2014/pdf/budoucnost/chemie/chemie_vedamabudoucnost_Kremr.pdf
- [30] DUELUND, Lars a Ole G. MOURITSEN. Contents of capsaicinoids in chillies grown in Denmark. *Food Chemistry*. 2017, 221(2), 913-918. ISSN 03088146. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616319239>
- [31] NAVES, Emmanuel Rezende, Lucas DE ÁVILA SILVA, Ronan SULPICE, Wagner L. ARAÚJO, Adriano NUNES-NESI, Lázaro E.P. PERES a ZSÖGÖN. Capsaicinoids: Pungency

beyond Capsicum. *Trends in Plant Science*. 2019, **24**(2), 109-120. ISSN 13601385. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138518302619>

- [32] *Aversion technologies, INC.: Capsaicin: History and Use of a Natural Deterrent* [online]. Ilidio R. S. Martins, 2008 [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: <https://aversiontech.com/wp-content/themes/aversiontech/pdf/Capsaicin%20-%20A%20History.pdf>
- [33] PEÑA-ALVAREZ, Araceli, Erika RAMÍREZ-MAYA, Luís Ángel ALVARADO-SUÁREZ, et al. Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2009, **1216**(14), 2843-2847 [cit. 2019-04-15]. ISSN 00219673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308017974>
- [34] BARBERO, Gerardo F., P. PALMA, Carmelo G. BARROSO, et al. Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction–high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2006, **578**(2), 227-233 ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267006014073>
- [35] BARTOŠ. *Stanovení kapsaicinu v biologickém materiálu*. Hradec Králové, 2014. Bakalářská práce. Univerzita Hradec Králové. Vedoucí práce Ing. Karel Musil.
- [36] PEÑA-ALVAREZ, Araceli, Erika RAMÍREZ-MAYA a Luís Ángel ALVARADO-SUÁREZ. Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009, **1216**(14), 2843-2847. ISSN 00219673. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308017974>
- [37] *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL* (1996) 16th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, Official Method 995.03
- [38] FIALA, Z., A. VYSKOČIL, V. KRAJÁK a J. TEJRAL. Polycyclic aromatic hydrocarbons. I. Environmental contamination and environmental exposure. *Acta Medica*. Hradec Králové, 1999, (42), 77-89. ISSN 1211-247X.
- [39] HOLOUBEK, Ivan. *Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) v prostředí*. Praha: Český ekologický ústav, 1996. ISBN 80-850-8744-8

- [40] *Příloha č. 1: základní charakteristiky a vlastnosti jednotlivých POPs*. [online] Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí. [vid. 2019-04-15]. Dostupné z: http://www.recetox.muni.cz/res/file/narodni_centrum/reg-centrum/unipo/Anex_01.pdf
- [41] Vznik polycyklických aromatických uhlovodíků. *Technické zařízení budov - info* [online]. 2004 [vid. 2019-04-16]. Dostupné z: <http://www.tzb-info.cz/1808-vznik-polycyklickych-aromatickych-uhlovodiku>
- [42] HOLOUBEK, I., přednáška Chemie životního prostředí I - Environmentální procesy, Chemické látky v prostředí - základní definice a pojmy. RECETOX, Masarykova univerzita, Brno.
- [43] *Arnika: polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs)* [online]. Praha, 2014 [cit. 2019-03-22]. Dostupné z: <https://arnika.org/polycyklicke-aromaticke-uhlovodiky-pahs>
- [44] FOAN, L., C. SABLAYROLLES, D. ELUSTONDO, E. LASHERAS, L. GONZÁLEZ, A. EDERRA, V. SIMON a J. M. SANTAMARÍA. Reconstructing historical trends of polycyclic aromatic hydrocarbon deposition in a remote area of Spain using herbarium moss material. *Atmospheric Environment* [online]. 2010, **44**(26), 3207-3214 [cit. 2019-04-15]. ISSN 13522310. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231010003924>
- [45] HOLOUBEK, I., P. KOŘÍNEK, Z. ŠEDA, et al. The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. *Environmental Pollution* [online]. 2000, **109**(2), 283-292 [cit. 2019-04-15]. ISSN 02697491. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749199002602>
- [46] *Bioindikátory*. [online]. Fakulta lesnická a environmentální [vid. 2019-04-15]. Dostupné z: http://fle.czu.cz/~ulbrichova/Skripta_HIO/kapitoly/Metody/bioindikatory.htm
- [47] *Stanovení Polycyklických Aromatických Uhlovodíků ve vodách a sedimentech metodou SFE-GC/MS* [online]. FRVŠ/G4/1506 Aplikace analytických metod do výuky hydrobiologie, 2009, s. 1-4 [vid. 2019-04-15]. Dostupné z: http://hydrobiologie.upol.cz/uploads/files/06_metody_stanoveni_pau_sfegcms.pdf
- [48] CATERINA, Michael J a David JULIUS. The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway. *Annual Review of Neuroscience* [online]. 2001, **24**(1), 487-517. ISSN 0147-006X. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.neuro.24.1.487>
- [49] GAWANDE, Manoj B., Sharad N. SHELKE, Radek ZBORIL a Rajender S. VARMA. Microwave-Assisted Chemistry: Synthetic Applications for Rapid Assembly of Nanomaterials

and Organics. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2014, **47**(4), 1338-1348 [cit. 2019-04-20] ISSN 0001-4842. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/ar400309b>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

AOAC	Asociace oficiálních analytických chemiků (Association of Official Analytical Chemists)
AcN	Acetonitril
DCM	Dichlormethan
FLD	Fluorescenční detektor
GC	Plynová chromatografie (Gas chromatography)
Hz (k, M)	Hertz (jednotka kmitočtu)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-performance Liquid Chromatography)
MAE	Mikrovlnná extrakce (Microwave Assisted Extraction)
MeOH	Methanol
MSD	Hmotnostně spektrometrický detektor (Mass Spectrometric Detector)
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PHWE	Pressurised Hot Water Extraction
PFE, PLE	Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (Pressurized Fluid Extraction), (Pressurized Liquid Extraction)
SFE	Extrakce nadkritickými tekutinami (Supercritical Fluid Extraction)
USE,UAE	Ultrazvuková extrakce (Ultrasound Extraction)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Soxhletův extraktor [autor].....	16
Obrázek 2 – Ultrazvuková lázeň [autor].....	19
Obrázek 3 – Ultrazvuková sonda [autor].....	19
Obrázek 4 - p-T fázový diagram čisté látky [autor]	20
Obrázek 5 - Zjednodušené schéma HPLC [autor].....	23
Obrázek 6 - Vzorce vybraných kapsacinoidů [30]	27
Obrázek 7 - Strukturní vzorce látek, obsažených v RM (16 US EPA PAH) [3].....	30
Obrázek 8 – Vzorky chilli pro stanovení kapsaicinu a dihydrokapsaicinu [autor]	33
Obrázek 9 – Křemenné filtry použité pro stanovení PAU [autor].....	34
Obrázek 10 – Očištěný vzorek mechu [autor]	34
Obrázek 11 - Soxhletův extraktor v laboratoři [autor]	37
Obrázek 12 - Ultrazvuková lázeň v laboratoři [autor].....	37
Obrázek 13 - Mikrovlnný systém Ethos Up v laboratoři [autor].....	38
Obrázek 14 - Koncentrátor Stuart v laboratoři [autor]	39
Obrázek 15 – Chromatogram kapsaicinoidů [autor]	40
Obrázek 16 – Kalibrační závislost kapsaicinu [autor].....	41
Obrázek 17 - Kalibrační závislost	41
Obrázek 18 - Chromatogram polycyklických aromatických uhlovodíků [autor].....	43
Obrázek 19 – Výsledky MAE extrakce různými.....	44
Obrázek 20 – Výsledky MAE extrakce různými.....	44
Obrázek 21 – Srovnání účinnosti extrakčních technik v různých rozpouštědlech [autor]	47
Obrázek 22 – Porovnání extrakční doby MAE [autor].....	48
Obrázek 23 – Malé objemy extraktů v různých nádobkách	49

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Nastavení HPLC pro stanovení kapsaicinoidů	40
Tabulka 2: Nastavení HPLC pro stanovení PAU	41
Tabulka 3: Retenční časy, vlnové délky a limity stanovitelnosti látek PAU	42
Tabulka 4: Srovnání extrakčních technik, mleté koření	45
Tabulka 5: Srovnání extrakčních technik, chilli kousky	46
Tabulka 6- Výskyt fluorovaných derivátů PAU	48

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Vyhodnocené výsledky PAU z křemenných filtrů, v sadě A-B

Příloha 2 - Vyhodnocené výsledky PAU z křemenných filtrů, v sadě C-E

Příloha 1 – Vyhodnocené výsledky PAU z křemenných filtrů, v sadě A-B

	Sada filtrů A - 12 filtrů na šestiny						Sada filtrů B – 12 filtrů na šestiny				
	Soxhlet DCM 4h		MAE DCM 20min		MAE DCM 1hod		MAE DCM 20min		MAE DCM 1hod		Soxhlet DCM 4h
	Vz1	Vz2	Vz4	Vz5	Vz6	Vz7	Vz8	Vz9	Vz10	Vz11	Vz 12
	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)
Naftalen	6,011	6,204	1,204	2,79	1,732	2,063	3,513	nest.	4,148	nest.	15,375
1-fluornaftalen	1469,413	1200,316	nest.	nest.	nest.	nest.	3,929	nest.	4,701	nest.	39,319
2-fluorbifenylyl	4028,626	3520,484	nest.	nest.	nest.	nest.	111,878	nest.	nest.	nest.	470,815
Acenaften	3,413	3,633	0,889	1,313	1,128	1,271	1,783	6,457	2,156	6,94	11,735
Fluoren	nest.	1,804	2,198	3,567	2,16	3,011	12,259	7,74	14,776	6,68	4,481
Fenanthren	5,976	6,75	3,878	4,769	4,365	4,472	15,725	19,313	16,859	16,128	15,488
Anthracen	1,81	1,955	0,714	0,879	0,975	nest.	3,414	1,932	1,98	nest.	5,036
Fluoranthren	13,648	15,882	9,247	12,747	7,293	13,106	45,394	51,982	47,736	47,527	47,216
Pyren	22,609	26,024	12,716	17,701	nest.	20,284	59,535	68,612	23,017	62,478	66,624
Benzo[a]anthracen	16,072	18,562	8,927	11,13	0,43	14,756	45,225	52,79	26,969	50,385	56,455
Chrysen	15,173	17,656	13,071	16,859	14,303	15,53	39,414	46,312	48,361	42,639	46,382
Benzo[b]fluoranthren	33,89	40,37	21,999	32,734	17,021	33,415	69,656	80,676	66,751	74,096	87,652
Benzo[k]fluoranthren	16,469	19,243	11,338	15,37	nest.	15,91	32,818	37,773	33,645	34,825	41,58
Benzo[a]pyren	39,754	45,011	4,198	2,746	nest.	17,199	23,38	94,22	39,271	97,137	179,252
Dibenz[a,h]anthracen	4,894	4,615	3,562	3,6	1,251	4,222	6,985	7,933	6,567	7,153	9,372
Benzo[g,h,i]perylene	85,231	97,862	26,004	55,846	1,652	73,412	116,054	166,179	nest.	160,464	237,179
Indeno[1,2,3cd]pyren	40,533	45,805	20,469	28,965	nest.	36,009	66,55	74,333	nest.	70,875	85,32
Navážka (g)	0,1892	0,2052	0,1750	0,1903	0,1687	0,1994	0,202	0,1976	0,192	0,1881	0,1716
Suma PAU mimo fluorované	305,483	351,376	140,414	211,016	52,31	254,66	541,705	716,252	332,236	677,327	909,147

Příloha 2 - Vyhodnocené výsledky PAU z křemenných filtrů, v sadě C-E

	Sada C - 8 filtrů na čtvrtiny				SadaD - 8 filtrů na čtvrtiny				Sada E - 8 filtrů na čtvrtiny			
	MAE DCM 20 min		MAE DCM 1 hod		MAE ACN 20 min		MAE ACN 1 hod		Soxhlet, DCM 4 hod		Soxhlet DCM 22 hod	
	Vz 13	Vz14	Vz15	Vz16	Vz.17	Vz18	Vz19	Vz20	Vz21	Vz22	Vz23	Vz24
	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)	(ng/g)
Naftalen	3,815		3,813	7,749	1,991	2,207	2,587	1,873	53,498	53,226		
1-fluornaftalen	1494,817	854,006	1011,915	944,517	1030,273	1196,786	1088,864	919,367	748,772	678,59	488,27	779,52
2-fluorbifenylyl	3747,614	3287,546	2787,353	2969,266	2535,833	3177,358	3794,278	3769,25	3188,567	3216,742	1639,511	2128,07
Acenaften	nest.	4,477	nest.	6,745	nest.	nest.	nest.	nest.	8,452	29,408	103,422	26,362
Fluoren	13,413	6,353	12,381	6,445	nest.	nest.	nest.	nest.	48,424	101,674	66,481	nest.
Fenanthren	16,691	18,461	15,654	17,106	3,326	9,976	3,467	2,101	25,788	20,311	57,723	18,302
Anthracen	nest.	nest.	2,223	nest.	2,806	1,958	nest.	0,955	28,323	25,899	62,766	nest.
Fluoranthren	43,397	36,187	31,816	41,231	8,092	18,064	12,583	nest.	115,004	178,809	65,035	60,977
Pyren	59,755	59,398	48,575	57,906	6,6	nest.	nest.	nest.	87,967	73,012	154,079	84,472
Benzo[a]anthracen	39,257	40,853	25,146	40,31	1,313	nest.	nest.	nest.	188,742	174,217	241,248	65,864
Chrysen	43,959	44,757	40,8	42,483	19,336	4,686	nest.	nest.	349,502	189,54	416,018	67,545
Benzo[b]fluoranthren	86,413	85,196	73,247	81,522	26,209	18,09	1,988	nest.	305,458	234,523	247,309	102,144
Benzo[k]fluoranthren	40,201	39,791	34,73	38,287	11,92	nest.	nest.	nest.	114,945	94,862	130,279	58,987
Benzo[a]pyren	2,216	100,272	nest.	112,641	nest.	nest.	nest.	nest.	586,413	683,287	857,572	299,851
Dibenz[a,h,i]anthracen	8,749	9,258	7,055	9,753	nest.	nest.	nest.	nest.	116,008	125,856	33,683	nest.
Benzo[g,h,i]perylene	210,469	221,245	31,017	234,63	21,121	nest.	nest.	nest.	605,866	516,754	673,322	312,279
Indeno[1,2,3-cd]pyren	88,92	84,017	64,505	89,784	20,498	nest.	nest.	nest.	2126,42	1905,737	530,379	nest.
Navážka (g)	0,1916	0,193	0,179	0,1909	0,192	0,1846	0,1800	0,1844	0,1792	0,1898	0,2003	0,1838
Suma PAU mimo fluorované	657,255	750,265	390,962	786,592	123,212	54,981	20,625	4,929	4760,81	4407,115	3639,316	1096,783